

La CÉLULA

Geoffrey M. Cooper
Robert E. Hausman

quinta edición

MARBÁN

Cooper & Hausman

La CÉLULA

quinta edición

Geoffrey M. Cooper & Robert E. Hausman

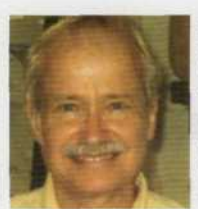
Boston University



Los autores



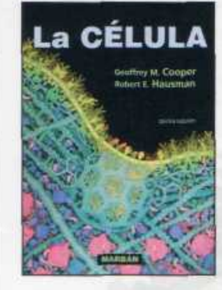
Geoffrey M. Cooper es Profesor y Jefe (*chair*) del Departamento de Biología en la Universidad de Boston. En 1973 se doctoró en Bioquímica en la Universidad de Miami, realizó la tesis doctoral con Howard Temin en la Universidad de Wisconsin, donde desarrolló ensayos de transferencia genética para detectar el ADN proviral del virus del sarcoma de Rous y los retrovirus relacionados. En 1975 ingresó en la facultad del *Dana-Farber Cancer Institute* y en la *Harvard Medical School*, ampliando esos estudios hacia la identificación de los oncogenes en tumores humanos. Desde su llegada a la Universidad de Boston en 1998, el Dr. Cooper ha empleado *La Célula* para sus clases de biología celular, también ha continuado sus investigaciones y participado en la importante expansión de la biociencia. Las investigaciones del Dr. Cooper se centran en el entendimiento de las funciones de las proteínas de los oncogenes en las vías de señalización que regulan la proliferación celular y la muerte celular programada. Ha publicado dos libros sobre cáncer y más de 100 artículos de investigación acerca de señalización celular y cáncer.



Robert E. Hausman es Profesor y Director (*graduate director*) del Departamento de Biología en la Universidad de Boston. Obtuvo el doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Northwestern en 1971, realizando la tesis doctoral junto a Aron Moscona en la Universidad de Chicago, donde investigó las interacciones célula-célula en las primeras fases del desarrollo embrionario y descubrió una de las moléculas de adhesión celular. En el año 1978 amplió sus investigaciones sobre las interacciones de la superficie celular en el desarrollo muscular y la regulación de la expresión genética en el desarrollo del sistema nervioso mediante contacto célula a célula. Ha sido profesor de biología celular y ha impartido cursos de especialización en la Universidad de Boston. Actualmente los profesores Cooper y Hausman imparten juntos biología celular. Su trabajo se centra en el entendimiento de cómo las interacciones celulares y entre células y la matriz extracelular afectan a la diferenciación y a la morfogénesis.



Joaquín María López, 72
28015 Madrid. España
Teléf.: (34) 91 543 55 55
Fax: (34) 91 544 13 80
www.marbanlibros.com



La cubierta

La cubierta ilustra los receptores de la superficie celular, la formación de una fosa recubierta de catrina, estructuras citoesqueléticas, ribosomas y otros componentes del citoplasma.

El artista

David S. Goodsell es Profesor Asociado de Biología Molecular en el Scripps Research Institute. Sus libros ilustrados, The Machinery of Life y Our Molecular Nature, exploran las moléculas biológicas y los distintos papeles que desempeñan en las células vivas. Su nuevo trabajo: Bionanotechnology: Lessons from Nature, presenta la creciente conexión entre biología y nanotecnología. Se puede encontrar más información en:
http://mgl.scripps.edu/people/goodsell

Edición en español de:
The Cell: a Molecular Approach, 5th edition
Geoffrey M. Cooper and Robert E. Hausman

Edición original
© ASM Press
Translated and published by arrangement
with ASM Press, Washington, DC; USA

Traducción: **Dra. N. Wright**
Centro de Investigaciones Biológicas
Madrid, España

ISBN: 978-84-7101-811-3 (**MARBÁN, S.L.** - Edición en español)
ISBN: 978-0-87893-300-6-2009 (ASM Press - Edición en inglés)

M-31575-LII
Impreso en España. *Printed in Spain*

Contenido



SECCIÓN I INTRODUCCIÓN





7 *Síntesis y maduración del ARN* 253

8 *Síntesis de proteínas, procesamiento y regulación* 309



9 Núcleo 355

10 Distribución y transporte de proteínas: retículo endoplásmico, aparato de Golgi y lisosomas 383

11 Bioenergética y metabolismo: mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas 433





15 *Señalización celular 603*

16 *Ciclo celular 653*

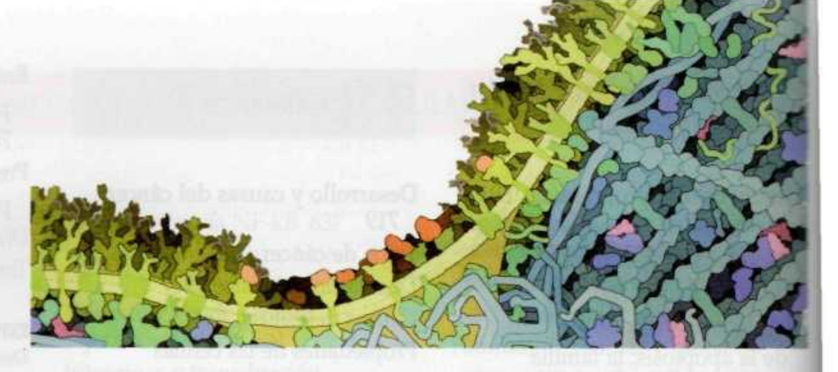


17 Muerte y renovación celular *693*

18 Cáncer *725*



Prefacio



Esta quinta edición de *La Célula*, mantiene el enfoque y los objetivos que han caracterizado las ediciones anteriores, esforzándose en hacer comprender a los estudiantes lo apasionante de la investigación y la base del progreso en esta área de la ciencia en constante movimiento. En este trabajo, se han incorporado los importantes y numerosos avances que han surgido desde la publicación de la edición anterior en 2008. Los progresos en genómica han sido especialmente llamativos, con nuevas tecnologías que han permitido la secuenciación rápida de genomas individuales –incluyendo los de James Watson y Craig Venter–, así como la identificación de genes que confieren susceptibilidad a una variedad de enfermedades comunes. De hecho, creemos que estos avances constantes pronto nos harán llegar a un punto donde la secuenciación del genoma personal se convierta en algo viable, con gran repercusión en la medicina personalizada. Los análisis genómicos a gran escala han ofrecido nuevas percepciones en la selección de alteraciones genéticas responsables de muchos tipos de cáncer, con implicaciones potenciales en el desarrollo de nuevos fármacos diana y tratamientos más refinados.

Junto con los avances en genómica, han surgido avances en epigenética, como la elucidación de la herencia epigenética de centrómeros en las eucariotas superiores, una apreciación de la complejidad de la modificación de histones en la regulación genética, y avances en la comprensión de la inactivación del cromosoma X por ARN no codificado. Asimismo, hemos llegado a reconocer el papel cada vez más extendido de los microARN en la regulación postranscripcional de los genes, no sólo respecto al comportamiento normal de las células, sino también en patologías como el cáncer y las cardiopatías. Por último, el adelanto más importante se ha producido en las potenciales aplicaciones clínicas de las células madre, notable sobre todo gracias al emocionante descubrimiento de que las células somáticas de adultos pueden reprogramarse para actuar como células madre pluripotentes en cultivos. Desde que se publicó la edición anterior, se han producido progresos en la resolución de ciertos problemas clásicos, como pueden ser el papel de las diferentes ADN-polimerasas eucariotas en la horquilla de replicación y el mecanismo de transporte de proteínas a través del aparato de Golgi.

Hemos querido presentar una vez más, no sólo la información más actualizada, sino también la emoción y los retos que nos ofrece la investigación en biología celular. Al mismo tiempo, *La Célula* continúa siendo un texto accesible y claro para estudiantes en su primer curso de biología celular y molecular. Entre los rasgos distintivos de este libro, se encuentran las secciones de *Medicina Molecular* y *Experimentos Clave*, que destacan aplicaciones clínicas y describen trabajos de investigación fundamentales, respectivamente. Los nuevos ensayos que aparecen en esta edición en el apartado *Experimentos Clave* incluyen el descubrimiento del ARN de interferencia (demostrando el tra-



bajo de Andrew Fire y Craig Mello) y la identificación de receptores odorantes como una gran familia de receptores asociados a proteínas G (destacando el trabajo de Linda Buck y Richard Axel). Junto con los experimentos considerados en el texto, estos ensayos muestran a los estudiantes los avances que se producen en nuestro campo y una idea de cómo se formulan las hipótesis y se interpretan los resultados. De la misma manera que en la edición anterior, cada capítulo también contiene múltiples notas al margen para resaltar áreas de interés o de relevancia médica, además de una lista de preguntas al final de cada capítulo con sus respectivas respuestas en las últimas páginas del libro. En nuestro afán de continuar dirigiendo *La Célula* hacia el análisis experimental, muchas de esas cuestiones llevan al alumno a pensar sobre enfoques experimentales o interpretar resultados, además de ofrecer una revisión del material.

Tanto en esta edición de *La Célula* como en las anteriores, nuestro objetivo más importante ha sido transmitir la ilusión y lo apasionante de la investigación de la célula y la biología molecular. Las oportunidades en nuestro campo nunca han sido mayores y esperamos que *La Célula* estimule a los estudiantes de hoy a conocer los retos de las investigaciones futuras.

Agradecimientos

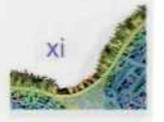
La quinta edición de *La Célula* se ha beneficiado aún más que en anteriores ediciones de los comentarios y sugerencias de los críticos, compañeros, profesores y estudiantes que leyeron la edición anterior.

Nuestro agradecimiento muy especial a los siguientes profesores por sus consejos y aportaciones:

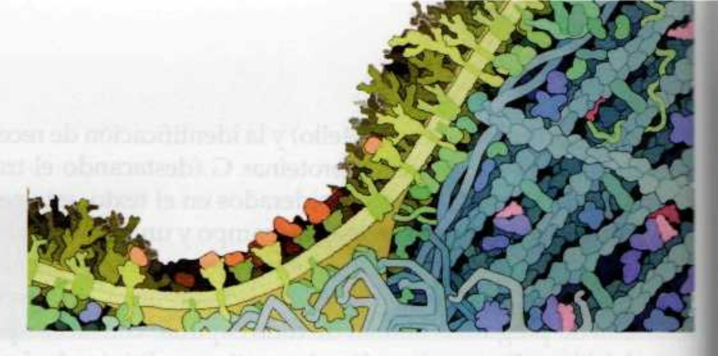
Dr. Felipe Kierszenbaum, *Michigan State University*
Dr. Karen Guzman, *Campbell University*
Dr. T. Page Owen, Jr., *Connecticut College*
Dr. Junjun Liu, *California State University, Pomona*
Dr. Floyd Knoop, *Creighton University*
Dr. Jason Bush, *California State University, Fresno*
Dr. Gene Settle, *University of Arizona*
Dr. Amelia Ahern-Rindell, *University of Portland*
(y a los comentarios de sus alumnos)
Dr. Cynthia Bradham, *Boston University*
Dr. Ulla Hansen, *Boston University*

Agradecemos una vez más a nuestros editores por su apoyo constante. Como siempre, ha sido un placer trabajar con Andy Sinauer y Dean Scudder de Sinauer Associates y con Jeff Holtmeier de ASM Press. Christopher Small y Janice Holabird han desempeñado un excelente trabajo en la creación de este libro. Nos satisface especialmente dar las gracias de nuevo a Chelsea Holabird por sus cuidados, paciencia y buen humor en el proceso de producción del libro.

Geoffrey M. Cooper y Robert E. Hausman



Organización y características de La Célula



La Célula es un texto accesible y sencillo que puede ser tratado en un único semestre, además de permitir a los alumnos dominar la materia a lo largo de todo el libro. Muchos de ellos deberán hacer cursos de introducción a la biología y química general, pero no de química orgánica, bioquímica o biología molecular. La organización y características del libro ayudarán a los estudiantes a acercarse y entender su contenido.

Organización

La Célula se divide en cuatro partes, cada una de las cuales es independiente, por lo que se puede cambiar fácilmente de tema o enfatizar aquello que se considere oportuno, en función de las necesidades de cada curso.

La primera parte incluye unos capítulos previos sobre la evolución de las células, métodos para estudiarlas, la química de las mismas, y los fundamentos de la biología molecular moderna. Para aquellos alumnos que tengan una base muy sólida por haber estudiado un curso de introducción a la biología u otro curso previo en biología molecular, estos capítulos pueden utilizarse para repasar.

La segunda parte se centra en la biología molecular de las células, tratando capítulos sobre la organización y secuencias del genoma, replicación, reparación y recombinación del ADN, transcripción y tratamiento del ARN, y la síntesis, tratamiento y regulación de proteínas. El orden sigue el curso de la información genética (ADN → ARN → proteína), y ofrece una visión general de estos temas concisa, pero actualizada.

La tercera parte contiene el bloque central de capítulos sobre estructura y función celular, incluyendo otros sobre el núcleo, los orgánulos citoplasmáticos, el citoesqueleto, la membrana plasmática y la matriz extracelular. Esta parte del libro comienza dando cobertura al núcleo, que introduce la biología molecular tratada en la segunda parte en el contexto de la célula eucariótica, para después continuar hacia el exterior a través de los orgánulos citoplasmáticos y el citoesqueleto, hasta la membrana de plasma y el exterior de la célula. Sin embargo, estos capítulos son relativamente independientes, siendo posible variar el orden según las necesidades de cada curso.

Por último, la cuarta parte se centra en la emocionante y acelerada zona de la regulación celular, tratando temas como la señalización celular, el ciclo celular, la muerte celular programada y las células madre. Esta parte termina con un capítulo sobre el cáncer, que sintetiza las consecuencias de los mecanismos reguladores de las células básicas.



Características

Varias características pedagógicas se han incorporado a *La Célula* para ayudar a los estudiantes a dominar su contenido. Éstas se explican a continuación a modo de guía para el alumno.

Organización de capítulos. Cada capítulo se divide en de tres a cinco secciones principales, que son, a su vez, subdivididas en un número parecido de subsecciones. El resumen que enumera las secciones principales al principio de cada capítulo ofrece una breve visión de sus contenidos.

Términos clave y glosario. Los términos clave aparecen en negrita y color rojo cada vez que se introducen en cada capítulo. Éstos se repiten en el resumen del mismo y su definición aparece en el glosario al final del libro.

Ilustraciones y microfotografías. Un programa de ilustraciones con dibujos a todo color y microfotografías se ha desarrollado cuidadosamente como complemento y refuerzo visual del texto.

Ensayos experimentales clave y en medicina molecular. Cada capítulo cuenta con dos ensayos experimentales clave o un experimento clave y un ensayo en medicina molecular. Estas características se han diseñado para dotar al alumno tanto de conocimientos sobre la base experimental de la célula, como de biología molecular y sus aplicaciones a la medicina moderna. Consideramos estos ensayos como una base útil para las secciones de discusión del alumno, que se pueden acompañar con el estudio del artículo original en los que se basan los experimentos clave.

Notas. En cada capítulo pueden encontrarse varias notas que resaltan brevemente los puntos de interés relacionados con el material tratado en el texto. Son un complemento al texto, y fomentan la discusión en clase.

Resumen de los capítulos. Se organizan en forma de esquema, donde aparecen las principales secciones y subsecciones de cada capítulo. Este formato "sección por sección" se complementa con la lista de términos clave introducidos en cada una de ellas, convirtiéndose en un repaso conciso, pero exhaustivo.

Preguntas y respuestas. Se ha diseñado un amplio conjunto de preguntas al término de cada capítulo (con sus respuestas al final del libro) para facilitar la revisión del material presentado en el capítulo, y alentar a los alumnos a usarlo para predecir o interpretar los resultados experimentales.

Referencias bibliográficas. La amplia lista de referencias bibliográficas que aparece al final de los capítulos permite acceder tanto a estudios como a artículos seleccionados de entre las fuentes primarias. Los estudios y artículos primarios se distinguen por [R] y [P] respectivamente.

Enlaces a páginas web. Los nuevos iconos situados en los márgenes llevan al alumno a conocer las animaciones, videos, juegos, problemas y otros materiales para el estudio que se encuentran en la red.

T E. HAUSMAN

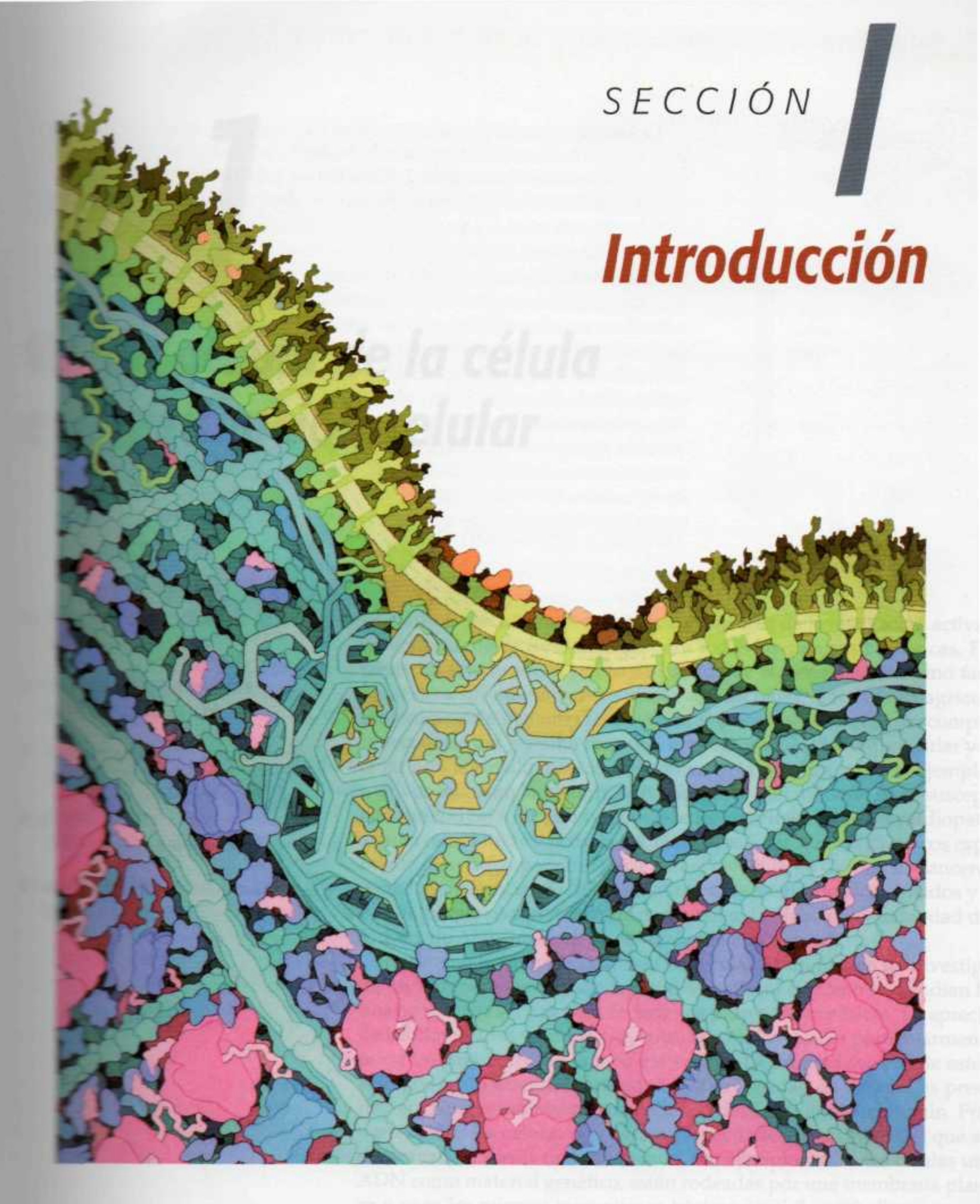


6.4 ANIMACIONES WEB

Genes de las cadenas pesadas

Durante el desarrollo de las células B, la recombinación específica de lugar une regiones de los genes de las cadenas pesadas de inmunoglobulina, dando lugar a la producción de cadenas pesadas de inmunoglobulina únicas.

A lo largo de todo el libro encontrará en los márgenes estos pequeños cuadros que se refieren a diversas animaciones web, que guardan relación al tema que se está tratando



SECCIÓN I

Introducción

CAPÍTULO 1

Visión global de la célula e investigación celular

LA BIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS CÉLULAS es un área de investigación activa cuyo entendimiento es fundamental para todas las ciencias biológicas. Esto es cierto no sólo desde el punto de partida de la ciencia básica, sino también respecto a un número creciente de aplicaciones prácticas en agricultura, biotecnología e ingeniería biomédica. Especialmente tras haber completado la secuencia del genoma humano, el progreso de la biología celular y molecular está abriendo nuevos horizontes en la práctica médica. Ejemplos llamativos incluyen la identificación de genes que influyen en la susceptibilidad individual a diversas enfermedades comunes, como las cardiopatías, la artritis reumatoide y la diabetes; el desarrollo de nuevos fármacos especialmente diseñados para interferir con el crecimiento de células cancerosas y con el uso potencial de células madre para sustituir tejidos dañados y tratar pacientes que padecen enfermedades como la diabetes, enfermedad de Parkinson, de Alzheimer y lesiones de la médula espinal.

Dado que la biología celular y molecular es un campo de investigación de rápido crecimiento, este capítulo se centrará en cómo se estudian las células, así como servirá para revisar sus propiedades básicas. La apreciación de las similitudes y diferencias entre las células resulta particularmente importante para entender la biología celular. La primera sección de este capítulo por tanto discutirá la unidad y la diversidad de las células presentes hoy en día en términos de su evolución desde un ancestro común. Por otra parte, todas las células comparten propiedades fundamentales que se han conservado a través de la evolución. Por ejemplo, todas las células utilizan ADN como material genético, están rodeadas por una membrana plasmática y usan los mismos mecanismos básicos para el metabolismo energético. Por otro lado, las células actuales han evolucionado en diferentes estilos de vida. Muchos organismos, como las bacterias, amebas y levaduras, se componen de células únicas capaces de autorreplicarse independientemente. Los organismos más complejos están compuestos por una colección de células que funcionan de manera coordinada, con diferentes células especializadas para desarrollar funciones particulares. El cuerpo humano, por ejemplo, está compuesto de más de 200 tipos diferentes de células, cada una de ellas especializada para una función distintiva como la memoria, la vista, el movimiento o la digestión. La diversidad exhibida por los diferentes tipos de células es sorprendente; por ejemplo, consideremos las diferencias entre las bacterias y las células del cerebro humano.

Las similitudes fundamentales entre los diferentes tipos de células proporcionan un marco común para la biología celular, permitiendo que los principios básicos aprendidos a partir de experimentos con un solo tipo de célula puedan ser extrapolados y generalizados a otros tipos de células. Diversos tipos de células y organismos son extensamente utilizados para estudiar los diferentes aspectos de la biología celular y molecular; la segunda sección de este capítulo expone algunas de las propiedades de estas células que las hacen particularmente valiosas como modelos experimentales. Finalmente, es importante reconocer que el progreso de la biología celular depende también de los instrumentos experimentales que permiten a los científicos hacer nuevas observaciones o desarrollar experimentos novedosos. Este capítulo de presentación concluye por tanto con una exposición sobre algunos experimentos utilizados para el estudio de las células, a la vez que resume algunos de los descubrimientos históricos que han llevado a nuestro conocimiento actual sobre la estructura de la célula y su función.

Origen y evolución de las células

Las células se dividen en dos clases principales, inicialmente definidas según contengan o no núcleo. Las **células procariotas** (bacterias) carecen de envoltura nuclear; las **células eucariotas** presentan un núcleo donde el material genético está separado del citoplasma. Las células procariotas son generalmente más pequeñas y simples que las células eucariotas; además de la ausencia de núcleo, sus genomas son menos complejos y no contienen orgánulos citoplasmáticos (Tabla 1.1). Al margen de estas diferencias, los mismos mecanismos moleculares básicos gobiernan las vidas de procariotas y eucariotas, indicando que todas las células presentes hoy descienden de un ancestro primordial único. ¿Cómo se desarrolló la primera célula? ¿Y cómo evolucionaron la complejidad y la diversidad que exhiben las células actuales?

La primera célula

Parece ser que la vida emergió hace, al menos, 3.800 millones de años, aproximadamente 750 millones de años después de que se formara la Tierra. Cómo se originó la vida y cómo la primera célula se convirtió en un ser son cuestiones de especulación, puesto que estos acontecimientos no pueden reproducirse en el laboratorio. No obstante, diferentes tipos de experimentos han proporcionado evidencias importantes sobre algunos pasos del proceso.

En 1920 se sugirió por primera vez que moléculas orgánicas simples podrían polimerizar espontáneamente y formar macromoléculas bajo las condiciones que se pensaba que existían en la atmósfera primitiva. En el momento en el que surgió la vida, la atmósfera de la Tierra se piensa que contenía poco o ningún oxígeno libre, constando principalmente de CO_2 y N_2 además de pequeñas cantidades de gases como H_2, H_2S y CO. Tal atmós-

Tabla 1.1 Células procariotas y eucariotas

Características	Procariota	Eucariota
Núcleo	Ausente	Presente
Diámetro de una célula típica	≈1 µm	10-100 µm
Orgánulos citoplasmáticos	Ausente	Presente
Contenido de ADN (pares de bases)	1×10^6 a 5×10^6	$1,5 \times 10^7$ a 5×10^9
Cromosomas	Una molécula de ADN circular	Múltiples moléculas de ADN lineal

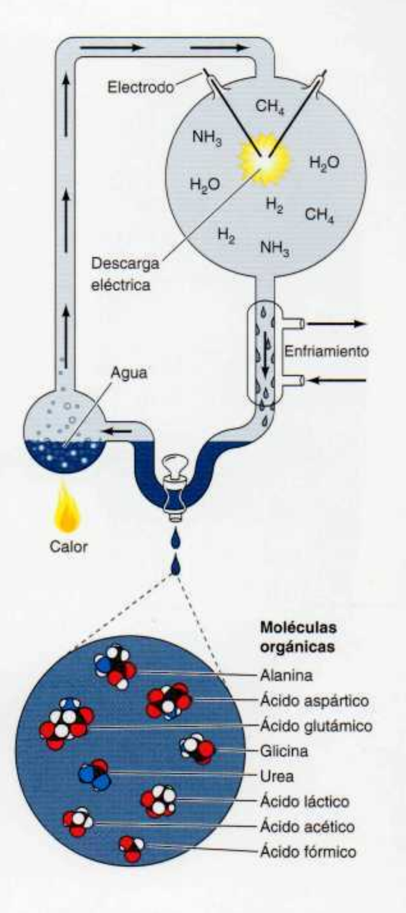


Figura 1.1 Formación espontánea de las moléculas orgánicas. El vapor de agua se expulsaba a una atmósfera que consistía en CH_4, NH_3 y H_2, en la que se descargaban chispas de electricidad. El análisis de los productos de la reacción reveló la formación de varias moléculas orgánicas, incluyendo los aminoácidos alanina, ácido aspártico, ácido glutámico y glicina.

fera proporciona condiciones reductoras en las que las moléculas orgánicas, con una fuente de energía como la luz solar o descargas eléctricas, se pueden formar espontáneamente. La formación espontánea de las moléculas orgánicas fue demostrada por primera vez experimentalmente en los años 50, cuando Stanley Miller (un estudiante graduado en aquel entonces) demostró que la descarga de chispas eléctricas en una mezcla de H_2, CH_4 y NH_3, en presencia de agua, conducía a la formación de una variedad de moléculas orgánicas, incluyendo varios aminoácidos (Fig. 1.1). Aunque el experimento de Miller no reprodujo con precisión las condiciones primitivas de la Tierra, claramente demostró la plausibilidad de la síntesis espontánea de las moléculas orgánicas, proporcionando los materiales básicos desde donde surgieron los primeros organismos vivos.

El siguiente paso en la evolución fue la formación de las macromoléculas. Se ha demostrado que los bloques monoméricos que constituyen las macromoléculas se polimerizan espontáneamente bajo condiciones prebióticas plausibles. El calentamiento de mezclas secas de aminoácidos, por ejemplo, da como resultado su polimerización para formar polipéptidos. Pero la característica fundamental de la macromolécula de la que surgió la vida debe tener la habilidad de replicarse por sí misma. Solamente una macromolécula capaz de dirigir la síntesis de nuevas copias de sí misma sería capaz de reproducirse y evolucionar.

De las dos clases principales de macromoléculas que aportan información en las células actuales (ácidos nucleicos y proteínas), sólo los ácidos nucleicos son capaces de dirigir su propia replicación. Los ácidos nucleicos pueden servir como molde para su propia síntesis como resultado del apareamiento de bases específicas entre nucleótidos complementarios (Fig. 1.2). Uno de los pasos críticos en el aprendizaje de la evolución molecular ocurrió a principios de los años 80, cuando se descubrió en los laboratorios de Sid Altman y Tom Cech que el ARN es capaz de catalizar numerosas reacciones químicas, incluyendo la polimerización de nucleótidos. El ARN es, por tanto, el único capaz de servir como molde y catalizar su propia replica-

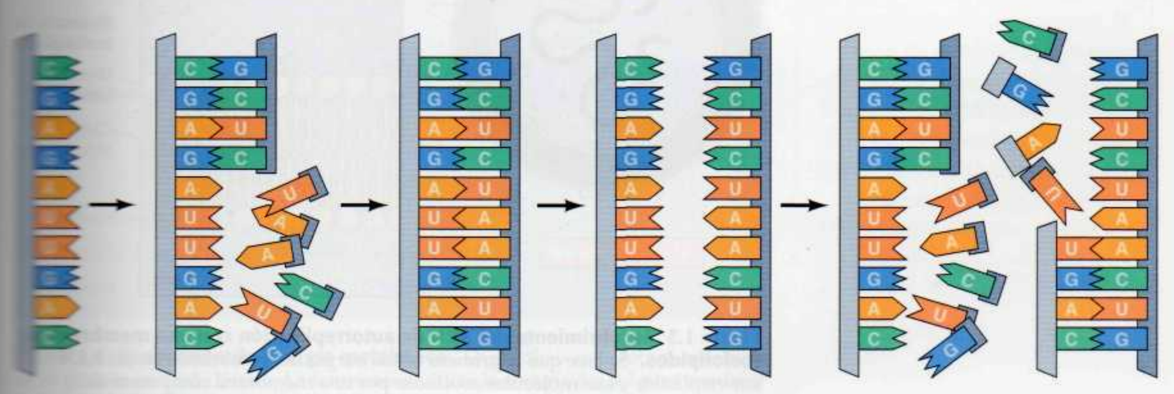


Figura 1.2 Autorreplicación propia del ARN. Las parejas complementarias entre los nucleótidos (adenina [A] con uracilo [U] y guanina [G] con citosina [C]) permiten que una hebra de ARN sirva como molde para la síntesis de una nueva hebra con la secuencia complementaria.

ción. Como consecuencia, se cree que el ARN ha sido el sistema genético inicial, y que una etapa temprana de la evolución química estuvo basada en moléculas de ARN con replicación propia —un período de la evolución conocido como el **mundo del ARN**—. Las interacciones en orden entre el ARN y los aminoácidos evolucionaron a lo que hoy es el código genético, y eventualmente el ADN reemplazó al ARN como el material genético.

Se presupone que la primera célula surgió de la envoltura del ARN de replicación propia en una membrana compuesta por **fosfolípidos** (Fig. 1.3). Tal y como se expondrá en detalle en el próximo capítulo, los fosfolípidos son los componentes básicos de todas las membranas biológicas presentes hoy día, incluyendo la membrana plasmática de células procariotas y eucariotas. La característica clave de los fosfolípidos que forman las membranas es que son moléculas **anfipáticas**, lo que quiere decir que una porción de la molécula es soluble en agua y la otra porción no. Los fosfolípidos presentan largas cadenas hidrocarbonadas insolubles en agua (**hidrofóbicas**) unidas a grupos solubles en agua (**hidrofílicos**) que contienen fosfatos. En contacto con el agua, los fosfolípidos espontáneamente se agrupan en una bicapa con los grupos que contienen fosfatos en el exterior en contacto con el agua y sus colas hidrocarbonadas en el interior en contacto unas con otras. Esta bicapa fosfolipídica forma una barrera estable entre dos compartimentos acuosos —por ejemplo, separando el interior de la célula de su ambiente externo.

La envoltura del ARN *autorreplicante* y las moléculas asociadas a una membrana lipídica se han mantenido, por tanto, como una unidad, capaz de reproducirse a sí misma y evolucionar. La síntesis de proteínas a partir del ARN pudo ya haber evolucionado, en cuyo caso la primera célula consistiría en un ARN de replicación propia y sus proteínas codificadas.

Evolución del metabolismo

Debido a que las células se originaron en un mar de moléculas orgánicas, éstas eran capaces de obtener alimento y energía directamente de su ambiente. Pero una situación como ésta es limitada en sí misma, por lo que las

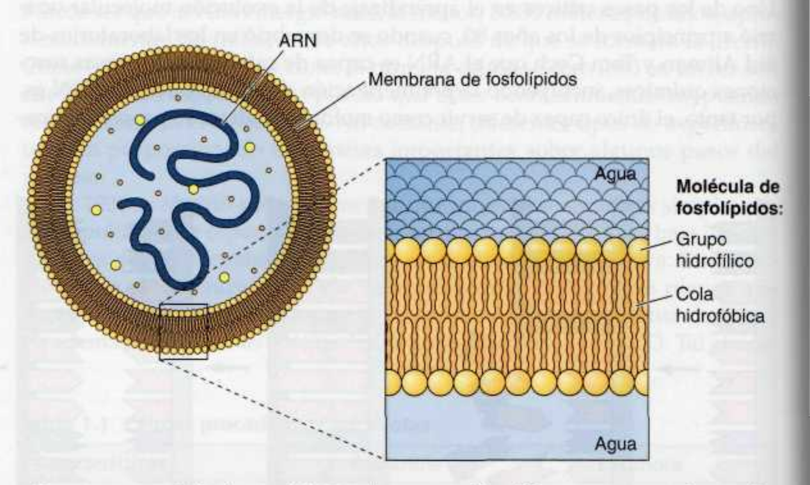


Figura 1.3 Recubrimiento del ARN de autorreplicación con una membrana de fosfolípidos. Se cree que la primera célula surgió del recubrimiento del ARN *autorreplicante* y sus moléculas asociadas por una membrana compuesta de fosfolípidos. Cada molécula de fosfolípidos presenta dos largas colas hidrofóbicas unidas a un grupo hidrofílico. Las colas hidrofóbicas están embebidas en la bicapa lipídica; las cabezas hidrofílicas están expuestas al agua a ambos lados de la membrana.

células necesitaron evolucionar sus propios mecanismos de creación de energía y sintetizar las moléculas necesarias para su replicación. La creación y la utilización controlada de la energía metabólica es primordial para todas las actividades celulares, y los procesos principales de metabolismo energético (analizados en detalle en el Cap. 3) se han conservado prácticamente intactos en las células actuales. Todas las células utilizan **adenosina 5′-trifosfato** (ATP) como fuente de energía metabólica para llevar a cabo la síntesis de los constituyentes celulares y conducir otras actividades que requieren energía, como el movimiento (p. ej., la contracción muscular). Los mecanismos utilizados por las células para generar ATP han evolucionado en tres etapas, correspondientes a la evolución de la glicólisis, fotosíntesis y metabolismo oxidativo (Fig. 1.4). El desarrollo de estos procesos metabólicos cambió la atmósfera de la Tierra, alterando en consecuencia el curso de la evolución.

En la atmósfera anaerobia inicial de la Tierra, las primeras reacciones generadoras de energía presumiblemente implicaron la escisión de moléculas orgánicas en ausencia de oxígeno. Estas reacciones parecen ser una forma de la actual **glicólisis** —la rotura anaerobia de la glucosa a ácido láctico, con la ganancia neta de energía de dos moléculas de ATP—. Además de utilizar ATP como su fuente de energía química intracelular, todas las células actuales llevan a cabo la glicólisis, de acuerdo con la idea de que estas reacciones surgieron muy pronto en la evolución.

La glicólisis proporcionó un mecanismo mediante el cual la energía en moléculas orgánicas ya formadas (p. ej., la glucosa) podía convertirse en ATP, que podía ser utilizado como fuente de energía para dirigir otras reacciones metabólicas. El desarrollo de la **fotosíntesis** fue el siguiente paso más importante de la evolución, que permitió a la célula generar energía a partir de la luz solar y ser independientes de la utilización de las moléculas orgánicas ya existentes. La primera bacteria fotosintética, que evolucionó hace más de 3 billones de años, probablemente utilizaba H_2S para convertir CO_2 en moléculas orgánicas —todavía algunas bacterias utilizan un proceso de fotosíntesis similar—. La utilización de H_2O como donante de electrones

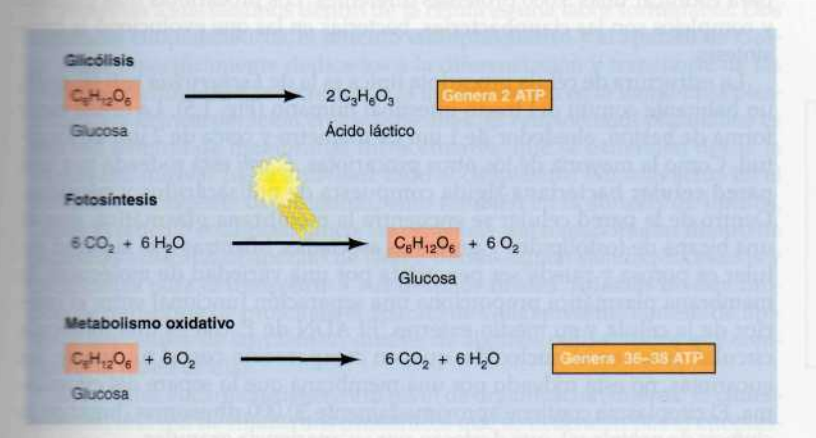


Figura 1.4 Generación de energía metabólica. La glicólisis es la rotura anaerobia de la glucosa en ácido láctico. La fotosíntesis utiliza la energía del sol para conducir la síntesis de la glucosa a partir del CO_2 y el H_2O, liberando O_2 como producto. El O_2 liberado por la fotosíntesis lo utiliza el metabolismo oxidativo, en el que la glucosa se rompe en CO_2 y H_2O, liberando mucha más energía que la obtenida de la glicólisis.

e hidrógeno para la conversión del CO_2 a compuestos orgánicos evolucionó más tarde y tuvo la importante consecuencia de cambiar la atmósfera de la Tierra. El uso de H_2O en reacciones fotosintéticas produce O_2 libre; se cree que este mecanismo ha sido el responsable de hacer a la atmósfera de la Tierra tan abundante en O_2.

La liberación de O_2 como consecuencia de la fotosíntesis cambió el medio en el que las células evolucionaron, y se cree que determinó el desarrollo del **metabolismo oxidativo**. Alternativamente, el metabolismo oxidativo podría haber evolucionado antes que la fotosíntesis, y el aumento del O_2 atmosférico proporcionaría una importante ventaja selectiva a los organismos capaces de utilizar O_2 en las reacciones de generación de energía. En cualquier caso, el O_2 es una molécula altamente reactiva, y el metabolismo oxidativo, usando esta reactividad, ha proporcionado un mecanismo de generación de energía a partir de moléculas orgánicas mucho más eficiente que la glicólisis anaerobia. Por ejemplo, la rotura oxidativa completa de la glucosa en CO_2 y H_2O produce energía equivalente a 36 ó 38 moléculas de ATP, en comparación con las dos moléculas de ATP que se forman en la glicólisis anaerobia (véase Fig. 1.4). Con pocas excepciones, las células actuales utilizan reacciones oxidativas como fuente principal de energía.

Procariotas actuales

Los procariotas actuales, que incluyen todos los tipos de bacterias, están divididos en dos grupos —las **arquebacterias** y las **eubacterias**— que se diferenciaron al principio de la evolución. Algunas arquebacterias viven en condiciones extremas, que hoy en día son inusuales pero que pudieron prevalecer en la primitiva Tierra. Por ejemplo, los termoacidófilos viven en pozos calientes de sulfuro con temperaturas hasta de 80 °C y valores de pH de 2. Las eubacterias incluyen las formas comunes que están presentes en nuestros días —un amplio grupo de organismos que viven en una gran variedad de ambientes, como la tierra, el agua y otros organismos (p. ej., los patógenos humanos).

La mayoría de las células bacterianas son esféricas, en forma de bastón, o espiral, con diámetros que oscilan de 1 a 10 μm. Su contenido de ADN varía desde unos 0,6 millones a 5 millones de pares de bases, cantidad suficiente para codificar unas 5.000 proteínas diferentes. Los procariotas más grandes y complejos son las **cianobacterias**, bacterias en las que evolucionó la fotosíntesis.

La estructura de célula procariota típica es la de ***Escherichia coli (E. coli)***, un habitante común del tracto intestinal humano (Fig. 1.5). La célula tiene forma de bastón, alrededor de 1 μm de diámetro y cerca de 2 μm de longitud. Como la mayoría de los otros procariotas, *E. coli* está rodeada por una **pared celular bacteriana** rígida compuesta de polisacáridos y péptidos. Dentro de la pared celular se encuentra la **membrana plasmática**, que es una bicapa de fosfolípidos y proteínas asociadas. Mientras que la pared celular es porosa y puede ser penetrada por una variedad de moléculas, la membrana plasmática proporciona una separación funcional entre el interior de la célula y su medio externo. El ADN de *E. coli* es una molécula circular única en el nucleoide, que, en comparación con el núcleo de los eucariotas, no está rodeado por una membrana que lo separe del citoplasma. El citoplasma contiene aproximadamente 30.000 **ribosomas** (lugar de la síntesis de proteínas), que destacan por su apariencia granular.

■ La existencia de organismos en condiciones extremas ha dado lugar a la hipótesis de que la vida podía existir en ambientes similares en otros lugares del sistema solar. El campo de la astrobiología (o exobiología) busca encontrar señales de esta vida extraterrestre.

Células eucariotas

Como las células procariotas, todas las células eucariotas están rodeadas por membranas plasmáticas y contienen ribosomas. No obstante, las células eucariotas son mucho más complejas y contienen un núcleo, variedad de



Figura 1.5 Micrografía electrónica de *E. coli*. La célula está rodeada por una pared celular, dentro de la que se encuentra la membrana plasmática. El ADN se encuentra en el nucleoide. (Menge and Wurtz/Biozentrum, University of Basel/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.).

orgánulos citoplasmáticos, y un citoesqueleto (Fig. 1.6). El orgánulo más grande y prominente de las células eucariotas es el **núcleo**, con un diámetro aproximado de 5 µm. El núcleo contiene la información genética de la célula, que en los eucariotas se encuentra organizada de forma linear en lugar de moléculas de ADN circular. El núcleo es el sitio de la replicación del ADN y de la síntesis del ARN; la traducción del ARN en proteínas tiene lugar en los ribosomas del citoplasma.

Además de un núcleo, las células eucariotas contienen una variedad de orgánulos delimitados por membranas dentro del citoplasma. Estos orgánulos proporcionan diferentes compartimentos en los que se localizan las distintas actividades metabólicas. Las células eucarióticas son por lo general más grandes que las células procariotas, con frecuencia presentando un volumen celular cien veces mayor. La compartimentalización proporcionada por los orgánulos citoplasmáticos es lo que permite a las células eucariotas funcionar con eficiencia. Dos de estos orgánulos, las **mitocondrias** y los **cloroplastos**, juegan papeles imprescindibles en el metabolismo energético. Las mitocondrias, que se encuentran en casi todas las células eucariotas, son los centros del metabolismo oxidativo y son por tanto las responsables de generar la mayoría del ATP derivado de la rotura de moléculas orgánicas. Los cloroplastos son los centros donde se lleva a cabo la fotosíntesis y se encuentran exclusivamente en las células de las plantas y algas verdes. Los **lisosomas** y los **peroxisomas** también proporcionan compartimentos metabólicos especializados para la digestión de macromoléculas y varias reacciones oxidativas, respectivamente. Además, la mayoría de las células de las plantas contienen grandes **vacuolas** que desarrollan variedad de funciones, incluyendo la digestión de macromoléculas y el almacenaje de productos de desecho y nutrientes.

Debido al tamaño y complejidad de las células eucariotas, el transporte de proteínas a sus destinos dentro de la célula es una labor formidable. Dos orgánulos citoplasmáticos, el **retículo endoplasmático** y el **aparato de Golgi**, están específicamente dedicados a la diferenciación y transporte de las proteínas destinadas a la secreción, a la incorporación en la membrana plasmática y a la incorporación en los lisosomas. El retículo endoplasmático es una red extensa de membranas intracelulares, que se extienden desde la membrana nuclear hasta atravesar todo el citoplasma. No solo actúa en el proceso y transporte de proteínas, sino también en la síntesis de lípidos. Desde el retículo endoplasmático, las proteínas son transportadas dentro de pequeñas vesículas al aparato de Golgi, donde siguen siendo procesadas y clasificadas para el transporte a sus destinos finales. Además de esta función de transporte de proteínas, el aparato de Golgi presenta síntesis de lípidos y (en células de las plantas) síntesis de algunos polisacáridos que componen la pared celular.

Las células eucariotas tienen otro nivel de organización interna: el **citoesqueleto**, una red de filamentos proteínicos que se extienden por el citoplasma. El citoesqueleto proporciona el marco estructural de la célula, determinando la forma celular y la organización general del citoplasma. Además, el citoesqueleto es responsable de los movimientos de todas las células (p. ej., la contracción de las células musculares), del transporte intracelular y la posición de los orgánulos y otras estructuras, incluyendo los movimientos de los cromosomas durante la división celular.

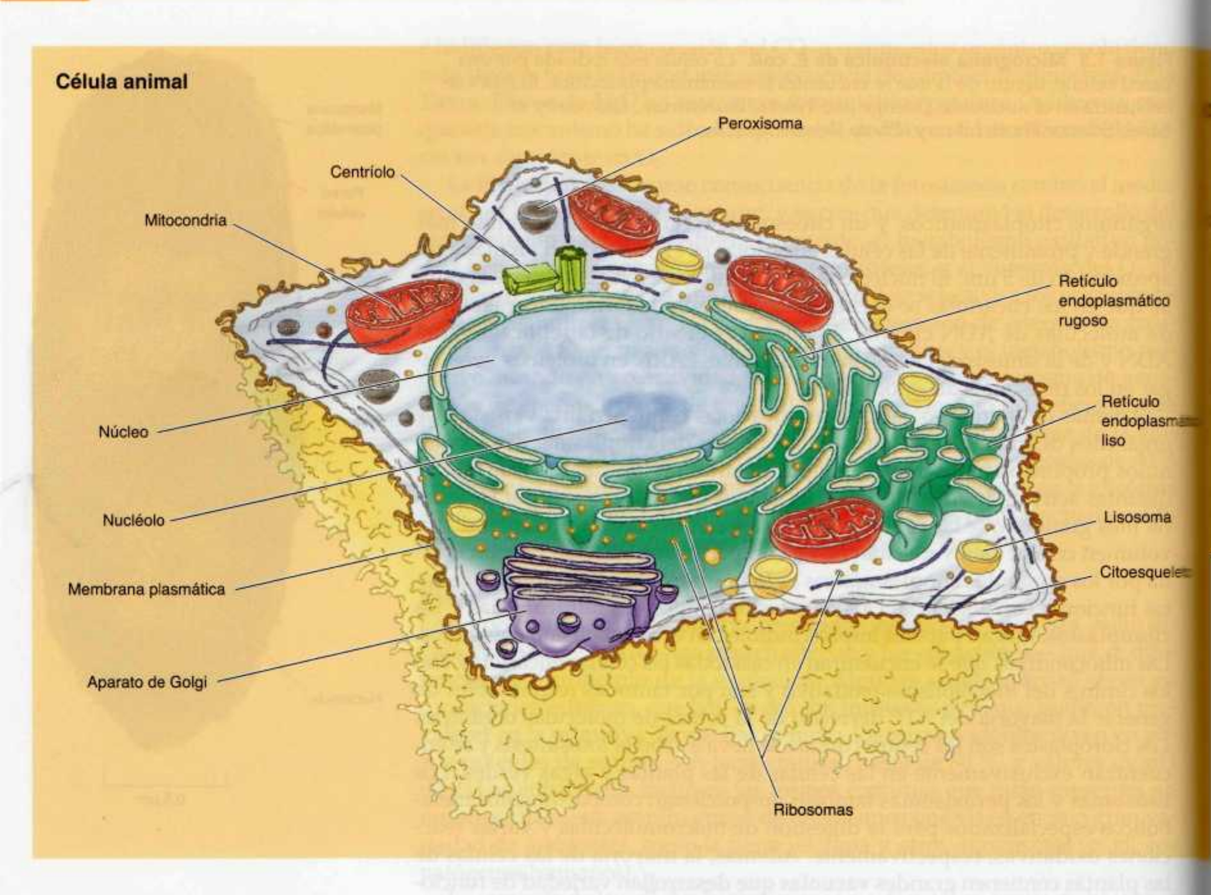
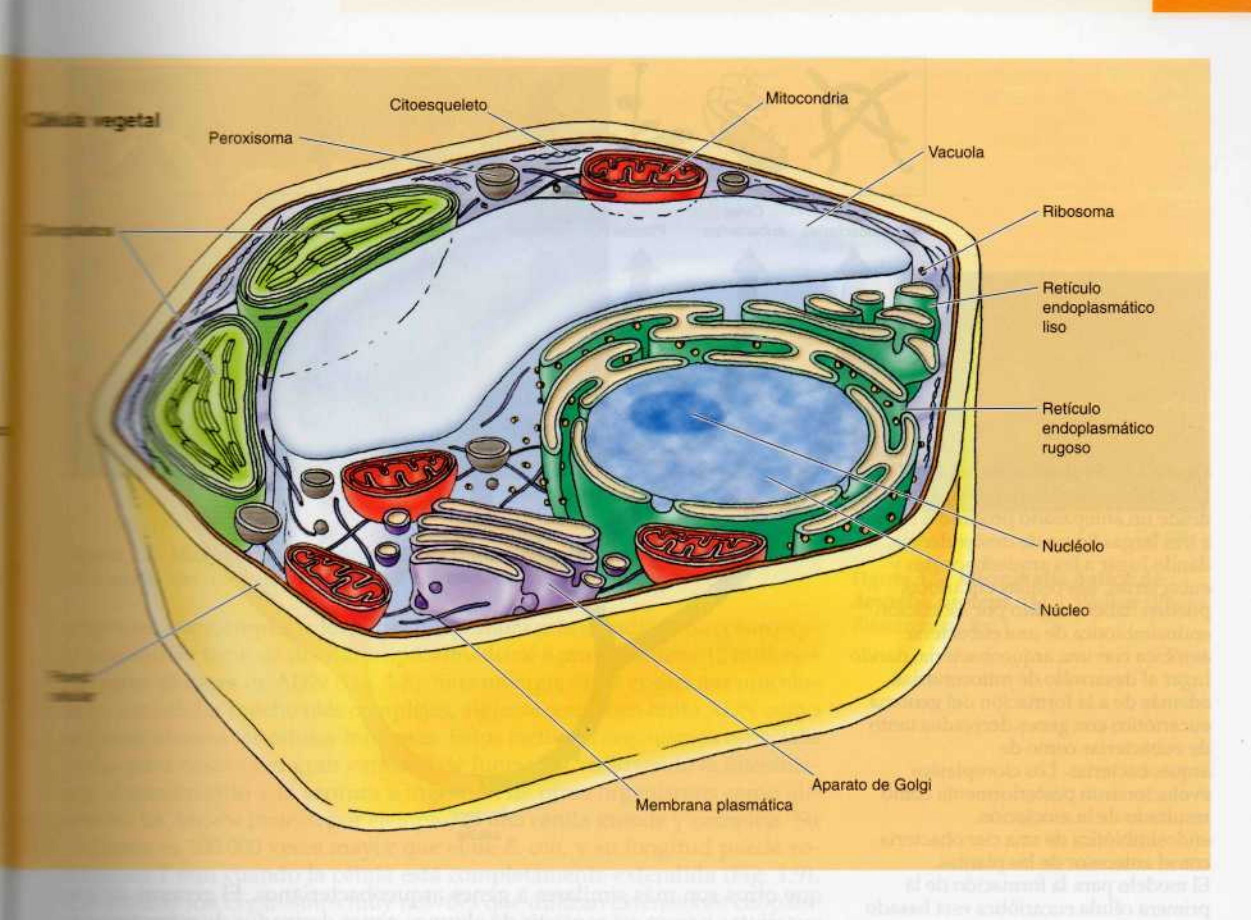


Figura 1.6 Estructuras de las células animales y vegetales. Las células animales y vegetales están rodeadas por una membrana plasmática y contienen un núcleo, un citoesqueleto y muchos orgánulos citoplasmáticos en común. Las células vegetales también están rodeadas por una pared celular y contienen cloroplastos y vacuolas grandes.

El origen de los eucariotas

Un paso crítico en la evolución de las células eucariotas fue la adquisición de orgánulos subcelulares encerrados por membranas, permitiendo el desarrollo de la complejidad característica de estas células. Los orgánulos de los eucariotas se cree que han surgido por **endosimbiosis** —una célula viviendo en el interior de otra—. En concreto, los orgánulos eucarióticos se cree que han evolucionado a partir de células procariotas que vivían en el interior de los ancestros de los eucariotas.

La hipótesis de que las células eucariotas evolucionaron por endosimbiosis está especialmente bien apoyada con los estudios de las mitocondrias y los cloroplastos, los cuales se cree que han evolucionado desde bacterias que vivían en células grandes. Las mitocondrias y los cloroplastos tienen un tamaño similar al de las bacterias, y como ellas, se reproducen mediante su escisión bipartita. Lo más importante es que las mitocondrias y los cloroplastos contienen su propio ADN, que codifica algunos de sus componentes. El ADN de las mitocondrias y cloroplastos se replica cada vez que el orgánulo se divide, y los genes que contiene se transcriben dentro del orgánulo y se traducen en los ribosomas de este. Por lo tanto, las mitocondrias y los cloroplastos contienen sus propios sistemas genéticos, que son diferentes del genoma nuclear de la célula. Además, los ribosomas y los ARN ribosómicos de estos orgánulos están más relacionados con los bacterianos que aquellos codificados por los genomas nucleares de los eucariotas.



En general, se ha aceptado un origen endosimbiótico de estos orgánulos, suponiendo que la mitocondria ha evolucionado a partir de las eubacterias aerobias y los cloroplastos de las eubacterias fotosintéticas, como las cianobacterias. La adquisición de bacterias aerobias podría provenir de una célula anaerobia con la habilidad de llevar a cabo un metabolismo oxidativo. La adquisición de bacterias fotosintéticas podría provenir de la independencia nutricional conseguida al desarrollar la fotosíntesis. Por tanto, estas asociaciones endosimbióticas resultaron muy beneficiosas para sus asociados, que fueron seleccionados en el curso de la evolución. A través del tiempo, la mayoría de los genes originalmente presentes en estas bacterias en apariencia pasaron a incorporarse dentro del genoma nuclear de la célula, así que solamente algunos componentes de las mitocondrias y cloroplastos siguen siendo codificados por los genomas de los orgánulos.

Algunos protistas marinos actuales engloban algas para que sirvan como endosimbiontes que llevan a cabo la fotosíntesis para sus hospedadores.

El origen preciso de las células eucarióticas sigue siendo un tema sin esclarecer en nuestra comprensión de la evolución temprana. Los estudios de sus secuencias de ADN indican que las arqueobacterias y eubacterias son tan distintas entre sí como cada una de ellas lo es de los eucariotas actuales. Por lo tanto, un suceso muy temprano en la evolución parece haber sido la divergencia de dos líneas de descendentes a partir de un ancestro procariótico común, dando lugar a las arqueobacterias y eubacterias actuales. Sin embargo, ha sido difícil determinar si algunos eucariotas evolucionaron a partir de eubacterias o a partir de arqueobacterias. Sorprendentemente, algunos genes eucarióticos son más similares a genes eubacterianos mientras

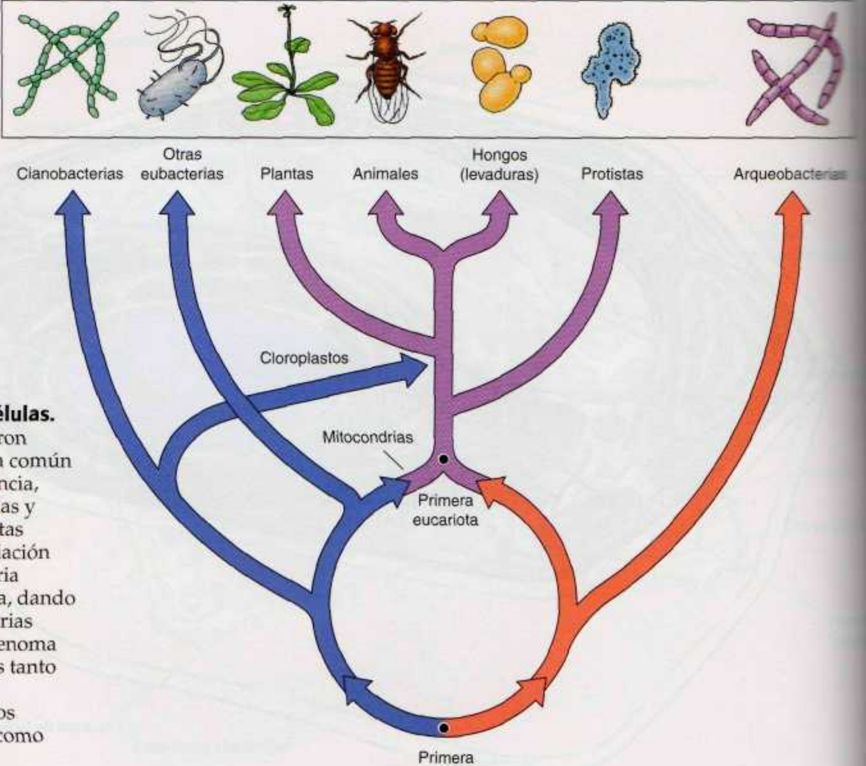


Figura 1.7 Evolución de las células. Las células actuales evolucionaron desde un antepasado procariota común a tres largas líneas de descendencia, dando lugar a las arqueobacterias y eubacterias. Las células eucariotas pueden haber surgido por asociación endosimbiótica de una eubacteria aeróbica con una arqueobacteria, dando lugar al desarrollo de mitocondrias además de a la formación del genoma eucariótico con genes derivados tanto de eubacterias como de arqueobacterias. Los cloroplastos evolucionaron posteriormente como resultado de la asociación endosimbiótica de una cianobacteria con el antecesor de las plantas. El modelo para la formación de la primera célula eucariótica está basado en M. C. Rivera y J. A. Lake, 2004. *Nature* 431: 152.

que otros son más similares a genes arqueobacterianos. El genoma de los eucariotas parece así consistir de algunos genes derivados de eubacterias y de otros procedentes de arqueobacterias, en lugar de reflejar un genoma de un ancestro eubacteriano o arqueobacteriano. Sorprendentemente, la mayoría de los genes eucarióticos relacionados con procesos de información (como la replicación del ADN, la transcripción y la síntesis de proteínas) proceden de las arqueobacterias, mientras que la mayor parte de los genes eucarióticos vinculados con procesos operativos básicos de la célula (como la glucolisis y la biosíntesis de aminoácidos) derivan de las eubacterias.

Una hipótesis reciente explica la naturaleza de mosaico de los genomas eucarióticos proponiendo que el genoma de los eucariotas surgió de una fusión de genomas arqueobacteriano y eubacteriano (Fig. 1.7). De acuerdo con esta proposición, una asociación endosimbiótica entre una eubacteria y una arqueobacteria fue seguida de una fusión de dos genomas procarióticos, dando lugar a un genoma eucariótico ancestral con contribuciones tanto de eubacterias como de arqueobacterias. La versión más sencilla de esta hipótesis es que una relación endosimbiótica inicial de una eubacteria que vivía en el interior de una arqueobacteria, dio lugar no sólo a las mitocondrias sino también al genoma de las células eucarióticas, conteniendo genes derivados de ambos ancestros procarióticos.

Desarrollo de organismos multicelulares

Muchos eucariotas son organismos unicelulares que, como las bacterias, se componen de células únicas capaces de su propia replicación. Los eucariotas más simples son las **levaduras**. Las levaduras son más complejas que las bacterias, pero mucho más pequeñas y simples que las células animales o

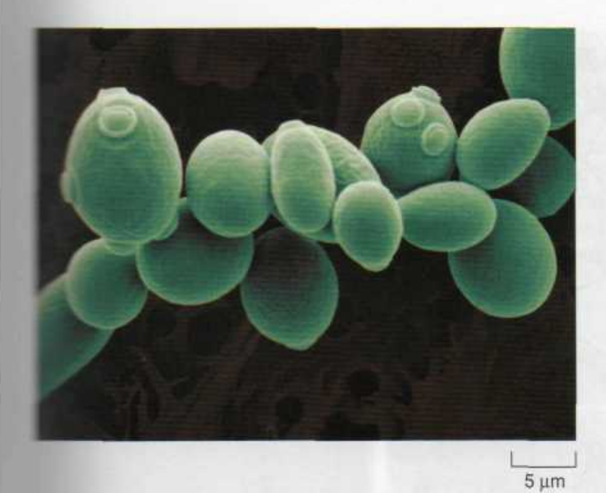


Figura 1.8 Micrografía electrónica de barrido de *Saccharomyces cerevisiae*. Micrografía con color artificial. (© Medical-on-Line/Alamy.)

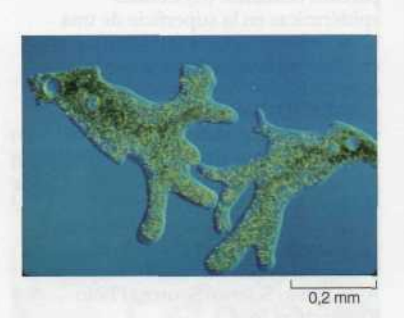


Figura 1.9 Micrografía óptica de *Amoeba proteus*. (M. I. Walker/Photo Researchers, Inc.)

vegetales. Por ejemplo, la levadura hasta ahora más estudiada ***Saccharomyces cerevisiae*** tiene un diámetro aproximado de 6 µm y contiene 12 millones de pares de bases de ADN (Fig. 1.8). Sin embargo, otros eucariotas unicelulares son células mucho más complejas, algunas contienen tanto ADN como el que contienen las células humanas. Estos incluyen organismos especializados para desarrollar gran variedad de funciones, incluyendo la fotosíntesis, el movimiento y la captura e ingestión de otros organismos como alimento. La *Amoeba proteus*, por ejemplo, es una célula grande y compleja. Su volumen es 100.000 veces mayor que el de *E. coli*, y su longitud puede sobrepasar 1 mm cuando la célula está completamente extendida (Fig. 1.9). Las amebas son organismos muy móviles que utilizan extensiones citoplasmáticas, llamadas *pseudopodia* o **pseudópodos**, para moverse y envolver a otros organismos, incluyendo bacterias y levaduras, como alimento. Otros eucariotas unicelulares (las algas verdes) contienen cloroplastos y son capaces de llevar a cabo la fotosíntesis.

Los organismos multicelulares evolucionaron de los eucariotas unicelulares hace más de 1.000 millones de años. Algunos eucariotas unicelulares forman agregados multicelulares que parecen representar una transición evolutiva desde una única célula a un organismo multicelular. Por ejemplo, las células de muchas algas (p. ej., el alga verde *Volvox*) se asocian unas con otras para formar colonias multicelulares (Fig. 1.10), las cuales se cree que son los precursores evolutivos de las plantas actuales. El aumento de la especialización celular determinó la transición de las colonias agregadas a los verdaderos organismos multicelulares. La continua especialización y la división de las funciones entre las células de un organismo ha proporcionado la complejidad y diversidad observada en los muchos tipos de células que componen las plantas y animales de hoy, incluyendo a los seres humanos.

Las plantas se componen de menos tipos de células que los animales, pero cada tipo diferente de célula vegetal está especializada para desarrollar funciones específicas requeridas por el organismo en su conjunto (Fig. 1.11). Las células vegetales están organizadas en tres sistemas de tejidos principales: tejido basal, tejido dérmico y tejido vascular. El tejido basal contiene a las células del parénquima, que lleva a cabo la mayoría de las reacciones metabólicas de la planta, incluyendo la fotosíntesis. El tejido basal también contiene dos tipos de células especializadas (células del colénquima y células del esclerénquima) que se caracterizan por paredes celula-

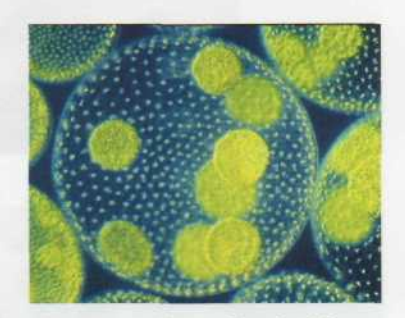


Figura 1.10 Alga verde colonial. Las células individuales de *Volvox* forman colonias que consisten en esferas huecas en las que están embebidas en una masa gelatinosa cientos o miles de células. (Cabisco/Visuals Unlimited.)

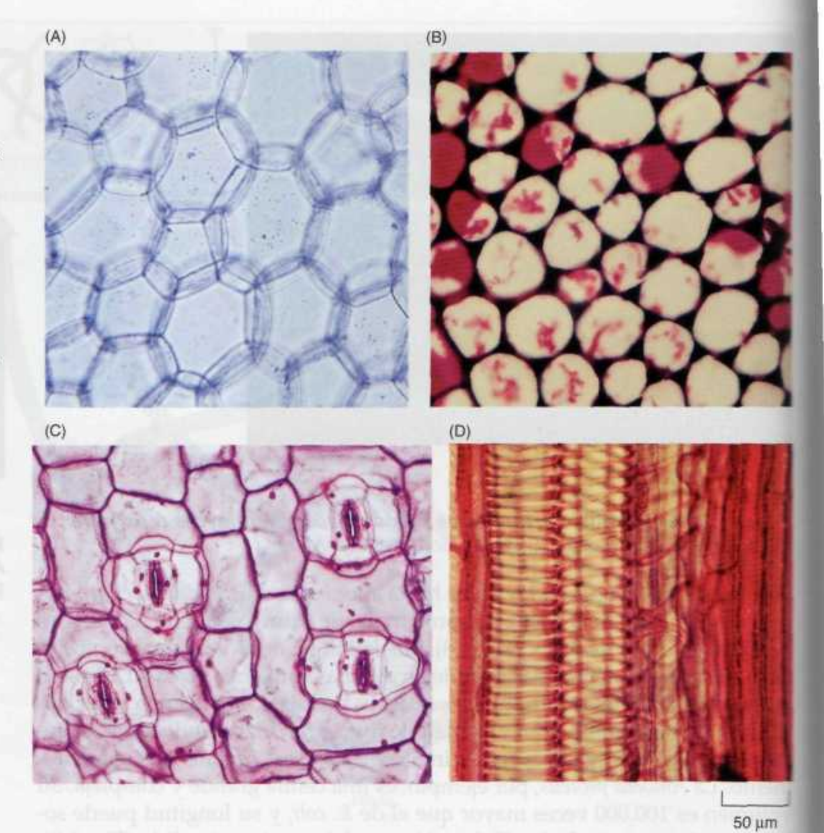


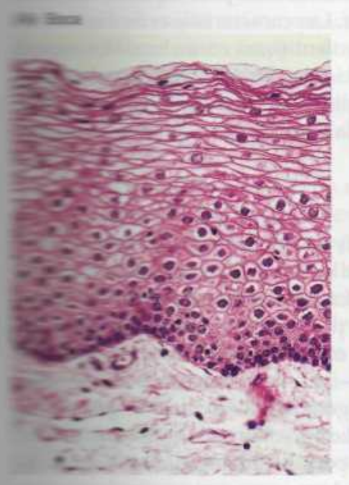
Figura 1.11 Micrografías ópticas de células vegetales representativas. (A) Células del parénquima, responsables de la fotosíntesis y de otras reacciones metabólicas. (B) Células del colénquima, especializadas para dar soporte y endurecer las paredes celulares. (C) Células epidérmicas en la superficie de una hoja. Pequeños poros (estomas) se encuentran flanqueados por células especializadas denominadas células guardia. (D) Los elementos de los vasos y las traqueidas son células alargadas que se disponen enfrentadas para formar los vasos del xilema. (A, Jack M. Bastsack/Visuals Unlimited; B, A. J. Karpoff/Visuals Unlimited; C, Alfred Owczarzak/Biological Photo Service; D, Biophoto Associates/Science Source/Photo Researchers Inc.)

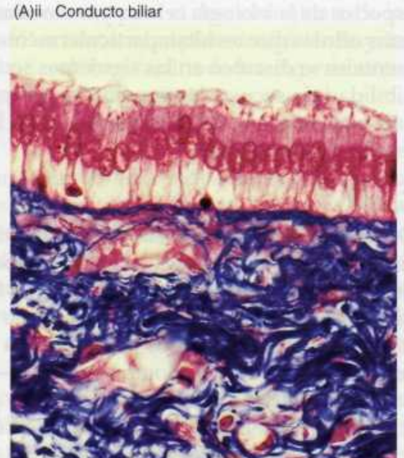
res gruesas y por proporcionar el soporte estructural de la planta. El tejido dérmico cubre la superficie de la planta y está compuesto por células epidérmicas, que forman un revestimiento de protección y permiten la absorción de nutrientes. Finalmente, el sistema vascular (el xilema y floema) está formado por diversos tipos de células alargadas, y es el responsable del transporte de agua y nutrientes a través de la planta.

Las células presentes en animales son considerablemente más diversas que las de las plantas. El cuerpo humano, por ejemplo, está compuesto por más de 200 tipos de células diferentes, consideradas generalmente como componentes de los cinco tipos principales de tejidos: tejido epitelial, tejido conectivo, sangre, tejido nervioso y tejido muscular (Fig. 1.12). Las **células epiteliales** forman láminas que cubren la superficie del cuerpo y delimitan los órganos internos. Existen muchos tipos diferentes de células epiteliales, cada una especializada para una función específica, incluyendo protección (la piel), absorción (p. ej., las células del intestino delgado), y secreción (p. ej., células de la glándula salivar). El tejido conectivo incluye hueso, cartílago y tejido adiposo, cada uno de los cuales está formado por diferentes tipos de células (osteoblastos, condrocitos y adipocitos, respectivamente). El tejido conectivo suelto que delimita con las capas epiteliales y rellena los espacios entre los órganos y tejidos del cuerpo está formado por otro tipo de células, los **fibroblastos.** La sangre contiene diferentes tipos de células: los glóbulos rojos (**eritrocitos**) funcionan en el transporte de oxígeno, y los glóbulos blancos (**granulocitos, monocitos, macrófagos** y **linfocitos**) funcionan en las reacciones inflamatorias y en la respuesta inmune. El tejido nervioso está formado por células nerviosas, o **neuronas**, que están altamente especializadas en la trasmisión de señales a través del cuerpo. Varios tipos

de células sensoriales, como las células del ojo y el oído, están aún más especializadas en la recepción de señales del ambiente. Finalmente, diferentes tipos de células musculares son responsables de la producción de fuerza y movimiento.

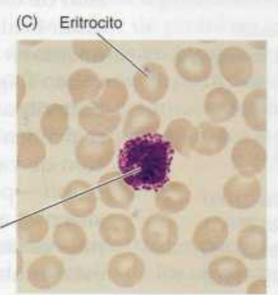
La evolución de los animales claramente implica el desarrollo de una diversidad y especialización considerable a nivel celular. Entender los mecanismos que controlan el crecimiento y diferenciación de estas células tan complejas y especializadas, desde la fertilización de un solo huevo, es uno de los mayores desafíos de la biología celular y molecular contemporánea.













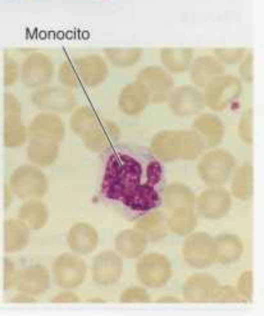


Figura 1.12 Micrografías ópticas de células animales representativas. (A) Células epiteliales de la boca (una lámina multiestratificada gruesa), conducto biliar e intestino. (B) Los fibroblastos son células del tejido conectivo caracterizadas por su forma de huso alargado. (C) Eritrocitos, granulocitos, linfocitos y monocitos en sangre humana. [(A)i y (A)ii, G. W. Willis/Visuals Unlimited; (A)iii, Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.; B, Don W. Fawcett/Visuals Unlimited; C, G. W. Willis/Visuals Unlimited.]

Células como modelos experimentales

La evolución de las células actuales a partir de su antepasado común tiene importantes implicaciones para la biología celular y molecular como ciencia experimental. Debido a que las propiedades fundamentales de todas las células se han conservado durante la evolución, los principios básicos obtenidos de los experimentos desarrollados con un solo tipo de célula son generalmente aplicables a otras células. Por otra parte, debido a la diversidad de las células actuales, muchos de los experimentos son más fáciles de llevar a cabo con un tipo de células en lugar de otras. Se utilizan diferentes tipos de células y organismos como modelos experimentales para estudiar diversos aspectos de la biología celular y molecular. Las características de algunas de estas células que resultan particularmente ventajosas como modelos experimentales se discuten en las siguientes secciones. En muchos casos, la disponibilidad de secuencias genómicas completas incrementa el valor de estos organismos como sistemas modelo para la comprensión de la biología molecular de las células.

E. coli

Debido a la simplicidad de su comparativa, las células procariotas (bacterias) son los modelos ideales para el estudio de los aspectos fundamentales de la biología molecular y la bioquímica. La especie de bacterias mejor estudiada es *E. coli*, que ha sido el organismo por excelencia en la investigación de los mecanismos básicos de la genética molecular. La mayoría de los conceptos actuales de la biología molecular —incluyendo nuestra comprensión sobre la replicación del ADN, el código genético, la expresión génica y la síntesis de proteínas— derivan de los estudios sobre esta humilde bacteria.

E. coli ha resultado especialmente útil para los biólogos moleculares debido a su relativa simplicidad y la facilidad para propagarse y ser estudiada en el laboratorio. El genoma de *E. coli*, por ejemplo, consiste en aproximadamente 4,6 millones de pares de bases y contiene aproximadamente unos 4.300 genes. El genoma humano es casi mil veces mayor (aproximadamente 3 billones de pares de bases) y se cree que contiene de 20.000 a 25.000 genes (véase Tabla 1.2). El tamaño pequeño del genoma de *E. coli* (que se secuenció por completo en 1997) proporciona claras ventajas para el análisis genético.

Los experimentos genéticos moleculares se ven facilitados por el rápido crecimiento de *E. coli* bajo condiciones de laboratorio predeterminadas. Bajo condiciones óptimas de cultivo, *E. coli* se divide cada 20 minutos. Además, una población clónica de *E. coli*, en la que todas las células se derivan de la división de una única célula original, se puede aislar fácilmente como una colonia en crecimiento en un medio que contenga agar semisólido (Fig. 1.13). Debido a que las colonias bacterianas que contienen más de 10^8 células se pueden desarrollar en una noche, la selección de variantes genéticas de una cepa de *E. coli* —por ejemplo, mutantes que son resistentes a un antibiótico, como la penicilina— es fácil y rápida. La facilidad con la que estos mutantes pueden ser seleccionados y

Tabla 1.2 Contenido de ADN en las células

Organismo	Contenido de ADN haploide (millones de pares de bases)	Número de genes
Bacteria		
Mycoplasma	0,6	470
E. coli	4,6	4.300
Eucariotas unicelulares		
Saccharomyces cerevisiae (levaduras)	12	6.000
Dictyostelium discoideum	70	Desconocido
Euglena	3.000	Desconocido
Plantas		
Arabidopsis thaliana	125	26.000
Zea mays (maíz)	5.000	Desconocido
Animales		
Caenorhabditis elegans (nematodo)	97	19.000
Drosophila melanogaster (mosca de la fruta)	180	14.000
Pollo	1.200	20–23.000
Pez cebra	1.700	20-25.000
Ratón	3.000	20–25.000
Humano	3.000	20–25.000

analizados resultó clave para el éxito de los experimentos que definen los principios básicos de la genética molecular, discutidos en el Capítulo 4.

Las mezclas nutritivas en las que *E. coli* se divide más rápidamente incluyen glucosa, sales y varios compuestos orgánicos, tales como aminoácidos, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos. No obstante, *E. coli* también puede crecer en un medio mucho más simple que contenga solamente sales, una fuente de nitrógeno (como el amoníaco), y una fuente de carbón y energía (como la glucosa). En este medio, la bacteria crece un poco más lenta (con un tiempo de división de unos 40 minutos) ya que tiene que sintetizar todos sus aminoácidos, nucleótidos y otros compuestos orgánicos. La habilidad de *E. coli* para llevar a cabo estas reacciones biosintéticas en un medio simple ha hecho que sea extremadamente útil para el descubrimiento de los procesos bioquímicos implicados. Por tanto, el rápido crecimiento y los simples requisitos nutricionales de *E. coli* han facilitado los experimentos fundamentales de la biología molecular y la bioquímica.

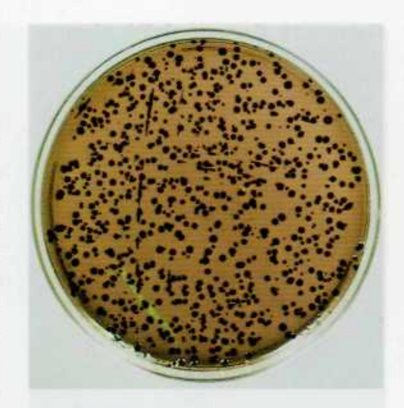


Figura 1.13 Colonias de bacterias. Fotografía de colonias de *E. coli* creciendo en la superficie de un medio de agar. (A. M. Siegelman/Visuals Unlimited.)

Levaduras

Aunque las bacterias han sido un modelo de valor incalculable para el estudio de muchas de las propiedades conservadas de las células, éstas obviamente no pueden ser utilizadas para estudiar aspectos de la estructura y función celulares que son únicos de eucariotas. Las levaduras, los eucariotas más simples, aportan numerosas ventajas experimentales similares a las de *E. coli*. En consecuencia, las levaduras han proporcionado un modelo crucial para el estudio de muchos de los aspectos fundamentales de la biología celular eucariota.

El genoma de la levadura que con más frecuencia se ha estudiado, *Saccharomyces cerevisiae*, consiste en 12 millones de pares de bases de ADN y contiene alrededor de 6.000 genes. Aunque el genoma de las levaduras es aproximadamente tres veces mayor que el de *E. coli*, resulta más manejable que los genomas de eucariotas más complejos, como el de los humanos. Incluso en su simplicidad, la célula de levadura exhibe las características típicas de las células eucariotas (Fig. 1.14): Contiene un núcleo distinto rodeado por una membrana nuclear, su ADN genómico está organizado en 16 cromosomas lineales, y su citoplasma contiene un citoesqueleto y orgánulos subcelulares.

Las levaduras pueden crecer con facilidad en el laboratorio y pueden ser estudiadas bajo muchos de los mismos protocolos genéticos moleculares que han resultado satisfactorios con *E. coli*. Aunque las levaduras no se replican tan rápidamente como las bacterias, se dividen cada 2 horas y pueden crecer fácilmente dando lugar a colonias a partir de una sola célula. Las levaduras se pueden utilizar en variedad de manipulaciones genéticas similares a aquellas que se pueden realizar utilizando bacterias.

Estas características han hecho a las levaduras las células eucariotas más accesibles desde el punto de vista de la biología molecular. Las levaduras mutantes han resultado importantes para la comprensión de muchos procesos fundamentales en eucariotas, incluyendo la replicación del ADN, transcripción, procesamiento del ARN, ensamblaje de proteínas y la regulación de la división celular, tal y como discutiremos en capítulos siguientes. La unidad de la biología celular molecular se presenta clara debido al hecho de que los principios generales de la estructura y función celulares revelados por los estudios de las levaduras se pueden aplicar a todas las células eucariotas.

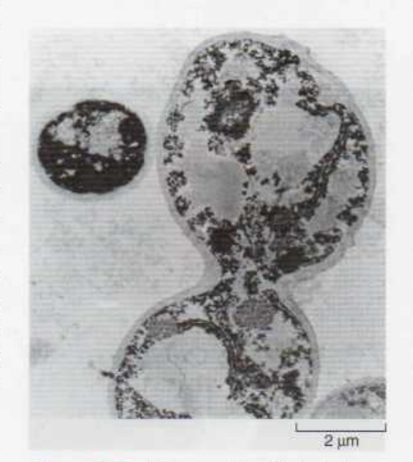


Figura 1.14 Micrografía electrónica de *Saccharomyces cerevisiae*. (David Scharf/Peter Arnold, Inc.)

Caenorhabditis elegans

Las levaduras unicelulares son modelos importantes para el estudio de las células eucariotas, pero entender el desarrollo de los organismos multicelu-

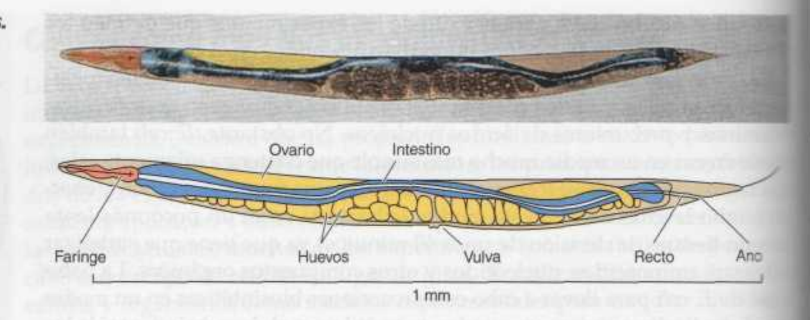


Figura 1.15 ***Caenorhabditis elegans.*** (De J. E. Sulston y H. R. Horvitz, 1977. *Dev. Biol.* 56: 110.)

lares requiere los análisis experimentales de plantas y animales, organismos que son mucho más complejos. El nemátodo ***Caenorhabditis elegans*** (Fig. 1.15) posee diversas características notables que hacen que sea uno de los modelos más utilizados en los estudios de desarrollo animal y diferenciación celular.

Aunque el genoma de *C. elegans* (aproximadamente 100 millones de pares de bases) es mayor que los eucariotas unicelulares, es más simple y más manejable que los genomas de la mayoría de los animales. Su secuencia ha sido determinada por completo, revelando que el genoma de *C. elegans* contiene aproximadamente 19.000 genes —alrededor de tres veces más que el número de genes de levaduras, y un quinto del número de genes previsibles en humanos—. Biológicamente, *C. elegans* es también un organismo multicelular relativamente simple: Las lombrices adultas solamente se componen de 959 células somáticas, y de 1.000 a 2.000 células germinales. Además, *C. elegans* puede ser reproducida con facilidad y ser sometida a manipulaciones genéticas en el laboratorio.

La simplicidad de *C. elegans* ha permitido que el curso de su desarrollo se haya estudiado en detalle mediante observación microscópica. Estos análisis han trazado satisfactoriamente el origen embrionario y el linaje de todas las células en la lombriz adulta. Los estudios genéticos también han identificado algunas de las mutaciones responsables de anormalidades del desarrollo, conduciendo al aislamiento y descripción de genes claves que controlan el desarrollo y diferenciación del nemátodo. Cabe destacar que se han encontrado similares genes que funcionan en animales complejos (incluyendo humanos), resultando *C. elegans* un importante modelo para los estudios del desarrollo animal.

Drosophila melanogaster

Al igual que *C. elegans*, la mosca de la fruta ***Drosophila melanogaster*** (Fig. 1.16) ha sido un modelo de organismo crucial en la biología del desarrollo. El genoma de *Drosophila* es de 180 millones de pares de bases, mayor que el de *C. elegans*, pero el genoma de *Drosophila* sólo contiene unos 14.000 genes. Además, el corto ciclo de reproducción de *Drosophila* (unas 2 semanas) la convierte en un organismo muy útil para los experimentos genéticos. Muchos conceptos fundamentales de la genética —como la relación entre genes y cromosomas— se derivaron de los estudios en *Drosophila* a principios del siglo veinte (véase Cap. 4).

Los exhaustivos análisis genéticos en *Drosophila* han descubierto muchos de los genes que controlan el desarrollo y la diferenciación, siendo los métodos actuales de la biología molecular los que han permitido el análisis en detalle de las funciones de estos genes. Como consecuencia, los estudios de *Drosophila* han permitido avanzar en el entendimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan el desarrollo animal, particularmente respecto a la formación del cuerpo de organismos multicelulares complejos. Al igual



Figura 1.16 ***Drosophila melanogaster.*** (Fotografía realizada por David McIntyre.)

que *C. elegans*, en vertebrados existen genes y mecanismos similares, validando el uso de *Drosophila* como uno de los modelos experimentales más importantes de la biología contemporánea del desarrollo.

Arabidopsis thaliana

El estudio del desarrollo y la biología molecular vegetal es un campo activo y en expansión de considerable importancia económica al igual que de interés intelectual. Desde que los genomas de las plantas cubren una dimensión de complejidad comparable a los genomas animales (véase Tabla 1.2), un modelo óptimo para el estudio del desarrollo vegetal sería un organismo relativamente simple que poseyera alguna de las ventajas de *C. elegans* y *Drosophila*. La pequeña planta con flor ***Arabidopsis thaliana*** (oruga) (Fig. 1.17) recoge estos criterios, por lo que se utiliza como modelo para el estudio de la biología molecular en plantas.

Arabidopsis es notable por su genoma de tan sólo unos 125 millones de pares de bases. Sin embargo, *Arabidopsis* contiene un total de unos 26.000 genes, muchos de los cuales están repetidos, de forma que el número de genes únicos de *Arabidopsis* es de aproximadamente 15.000 —una complejidad similar a la de *C. elegans* y *Drosophila*—. Además, la *Arabidopsis* es fácil de cultivar en el laboratorio, y ya se han desarrollado métodos para su manipulación genética molecular. Estos estudios han llevado a la identificación de genes implicados en varios aspectos del desarrollo vegetal, como es el desarrollo de las flores. El análisis de estos genes indica la existencia de numerosas similitudes, pero también diferencias notables, entre los mecanismos que controlan el desarrollo de vegetales y animales.



Figura 1.17 ***Arabidopsis thaliana.*** (Jeremy Burgess/Photo Researchers, Inc.)

Vertebrados

Los animales más complejos son los vertebrados, incluyendo a los humanos y otros mamíferos. El genoma humano se compone aproximadamente de 3 billones de pares de bases —alrededor de 20-30 veces más que los genomas de *C. elegans*, *Drosophila* o *Arabidopsis*— y contiene entre 20.000 y 25.000 genes. Además, el cuerpo humano se compone de más de 200 clases diferentes de tipos de células especializadas. Esta complejidad hace que los vertebrados sean difíciles de estudiar desde el punto de vista de la biología celular y molecular, aunque el mayor interés de las ciencias biológicas nace del deseo de entender el organismo humano. Además, entender muchas de las cuestiones sobre la importancia de la práctica inmediata (p. ej., en medicina) deben estar basadas en estudios de células humanas (o estrechamente relacionadas).

Un avance importante en el estudio de células humanas y de los mamíferos es el crecimiento de células aisladas en cultivo, donde pueden ser manipuladas bajo condiciones de laboratorio controladas. El uso de células cultivadas ha permitido realizar estudios sobre diversos aspectos de la biología celular de los mamíferos, incluyendo experimentos que han iluminado los mecanismos de la replicación del ADN, expresión génica, síntesis y procesamiento de proteínas, y división celular. Además, la habilidad de cultivar células en un medio químico definido ha permitido realizar estudios sobre los mecanismos de señales que normalmente controlan el crecimiento y la diferenciación celular en el organismo intacto.

Las propiedades especializadas de algunos tipos de células altamente diferenciadas han hecho de ellas importantes modelos para el estudio de aspectos determinados de la biología celular. Las células musculares, por ejemplo, están altamente especializadas para realizar la contracción, produciendo fuerza y movimiento. Debido a esta especialización, las células musculares son un modelo crucial para el estudio del movimiento celular a nivel molecular. Otro ejemplo lo proporciona las células nerviosas (neuronas),



Figura 1.18 Huevos de la rana *Xenopus laevis*. (Cortesía de Michael Danilchik y Kimberly Ray.)

que están especializadas en la conducción de señales electroquímicas a larga distancia. En humanos, los axones de las células nerviosas pueden tener más de un metro de largo, y algunos invertebrados, como el calamar, tienen neuronas gigantes con axones de hasta 1 mm de diámetro. Debido a su estructura y función tan especializadas, estas neuronas gigantes han sido importantes modelos en el estudio del transporte de iones a través de la membrana, y del papel del citoesqueleto en el transporte de orgánulos citoplasmáticos.

La rana ***Xenopus laevis*** es un modelo importante para los estudios del desarrollo temprano de los vertebrados. Los huevos de *Xenopus* son normalmente grandes células, con un diámetro aproximado de 1 mm (Fig. 1.18). Debido a que estos huevos se desarrollan fuera de la madre, todas las etapas del desarrollo desde el huevo hasta el renacuajo se pueden estudiar con facilidad en el laboratorio. Además, los huevos de *Xenopus* se pueden obtener en grandes cantidades, facilitando el análisis bioquímico. Gracias a estos avances técnicos, se ha utilizado *Xenopus* ampliamente en estudios sobre el desarrollo biológico y ha proporcionado importantes descubrimientos en los mecanismos que controlan el desarrollo, diferenciación y división celular del embrión.

El **pez cebra** (Fig. 1.19) posee numerosas ventajas para los estudios genéticos del desarrollo de los vertebrados. Este pequeño pez es fácil de mantener en el laboratorio y se reproduce con rapidez. Además, los embriones se desarrollan fuera de la madre y son transparentes, por lo que las primeras etapas del desarrollo pueden ser observadas con claridad. Se han desarrollado métodos poderosos para facilitar el aislamiento de las mutaciones que afectan al desarrollo del pez cebra, consiguiendo la identificación de varios cientos de estas mutaciones. Ya que el pez cebra es un vertebrado de fácil estudio, promete ser el puente entre los humanos y los sistemas más simples de invertebrados, como *C. elegans* y *Drosophila*.

Entre los mamíferos, el ratón es el más manejable para los análisis genéticos, lo cual se facilitará con la reciente finalización de la secuenciación del genoma del ratón. Aunque las dificultades técnicas de estudio de la genética del ratón (comparada, p. ej., a la genética de las levaduras o *Drosophila*) son inmensas, se han identificado varias mutaciones que afectan al desarrollo del ratón. Más importantes aún son los recientes avances en la biología molecular que han permitido la producción de ratones obtenidos mediante ingeniería genética, en los que se han introducido genes mutantes específicos en la línea germinal del ratón, por lo que sus efectos en el desarrollo u otros aspectos de la función celular pueden ser estudiados en el contexto

(A)



(B)



Figura 1.19 Pez cebra. (A) Embrión de 24 horas. (B) Pez adulto. (A, cortesía de Charles Kimmel, University of Oregon; © Max Gibbs/OSF/Photolibrary.com.)

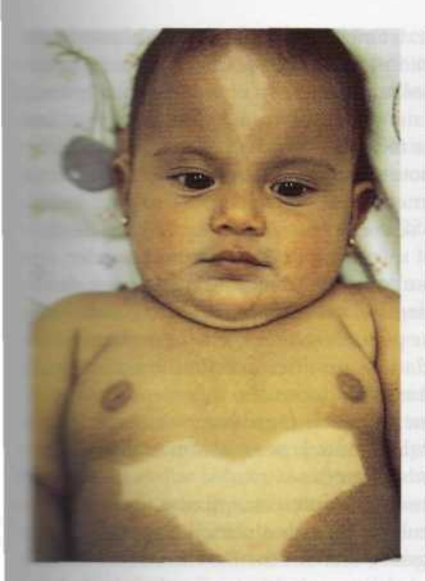




Figura 1.20 El ratón como modelo del desarrollo humano. Niño y ratón muestran defectos similares en la pigmentación (piebaldismo) como resultado de mutaciones en un gen necesario para la migración normal de los melanocitos (células responsables de la pigmentación de la piel) durante el desarrollo embrionario. (Cortesía de R. A. Fleischman, Markey Cancer Center, University of Kentucky.)

del animal completo. La manejabilidad del ratón como modelo del desarrollo humano se corresponde con el hecho de que las mutaciones en genes homólogos dan lugar a defectos del desarrollo similares en ambas especies; el piebaldismo es un ejemplo claro (Fig. 1.20).

Instrumentos de la biología celular

Como en todas las ciencias experimentales, la investigación en biología celular depende de los métodos de laboratorio que se puedan utilizar para estudiar la estructura y función celulares. Muchos avances importantes sobre el funcionamiento de las células han conducido directamente al desarrollo de nuevos métodos de investigación. La apreciación de los instrumentos experimentales disponibles para el biólogo celular resulta por tanto crítica para entender el estado actual y futuro de las direcciones de este área de la ciencia que se mueve con tanta rapidez. Algunos de los métodos generales importantes de la biología celular están descritos en secciones siguientes. Otros avances experimentales, que incluyen los métodos de la bioquímica y de la biología molecular, se discutirán en capítulos posteriores.

Microscopia óptica

Debido a que la mayoría de las células son demasiado pequeñas para ser observadas a simple vista, el estudio de las células ha dependido primordialmente del uso del microscopio. Es más, el descubrimiento real de las células surgió del desarrollo del microscopio: Robert Hooke fue el primero que acuñó el término de «célula» siguiendo sus observaciones de una pieza de corcho con un simple microscopio óptico en 1665 (Fig. 1.21). Utilizando un microscopio que ampliaba los objetos hasta 300 veces su tamaño real, Antony van Leeuwenhoek, en 1670 y años posteriores, fue capaz de observar diferentes tipos de células, incluyendo esperma, glóbulos rojos y bacterias. La propuesta de la teoría celular planteada por Matthias Schleiden y Theodor Schwann en 1838 debe tomarse como el nacimiento de la biología celular contemporánea. Los estudios microscópicos de tejido vegetal por Schleiden y los de tejido animal por Schwann condujeron a la misma conclusión: Todos los organismos están compuestos por células. Más tarde, se reconoció que las células no se forman *de novo* sino que emergen únicamen-

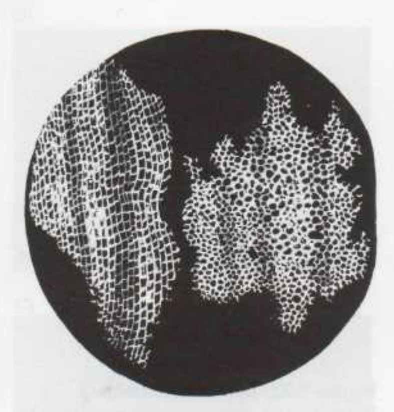


Figura 1.21 Estructura celular del corcho. Una reproducción de un dibujo de Robert Hooke de una lámina de corcho examinada con un microscopio óptico. Las «células» que Hooke observó fueron en realidad las paredes celulares que quedan cuando las células han muerto hace tiempo.

te por la división de las células preexistentes. Por tanto, la célula consiguió su actual reconocimiento como la unidad fundamental de todos los organismos vivos debido a las observaciones realizadas con el microscopio óptico.

El microscopio óptico continúa siendo un instrumento básico para los biólogos celulares, que con mejoras técnicas permiten la visualización de los detalles aumentados de la estructura celular. Los microscopios ópticos contemporáneos son capaces de aumentar los objetos hasta unas mil veces. Dado que la mayoría de las células se encuentran entre 1 y 100 μm de diámetro, pueden ser observadas en el microscopio óptico, como pueden ser también algunos de los orgánulos subcelulares, como el núcleo, los cloroplastos y las mitocondrias. Sin embargo, el microscopio óptico no es lo suficientemente poderoso para observar pequeños detalles de la estructura celular, cuya **resolución** —la capacidad de un microscopio para distinguir objetos separados por pequeñas distancias— es mucho más importante que el aumento. Las imágenes se pueden aumentar tanto como se desee (p. ej., mediante la proyección en una pantalla grande), pero tal aumento no incrementa el nivel de detalle que se puede observar.

El límite de resolución del microscopio óptico es aproximadamente de 0,2 μm; dos objetos separados por menos de esta distancia aparecen como una única imagen, en lugar de distinguirse una de otra. Esta limitación teórica de la microscopia óptica está determinada por dos factores —la longitud de onda (λ) de la luz visible y el poder de captación de luz de las lentes del microscopio (apertura numérica, *AN*)— de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Resolución} = \frac{0{,}61\lambda}{AN}$$

La longitud de onda de la luz visible es de 0,4 a 0,7 μm, por lo que el valor de λ se calcula en 0,5 μm para el microscopio óptico. La apertura numérica puede preverse como el tamaño del cono de luz que entra en la lente del microscopio después de pasar a través de la muestra (Fig. 1.22). Esto se obtiene de la ecuación

$$\text{AN} = \eta \sin \alpha$$

donde η es el índice de refracción del medio a través del cual la luz viaja entre la muestra y la lente. El valor de η para el aire es de 1,0, pero puede aumentar hasta un máximo aproximado de 1,4 utilizando una lente inmersa en aceite para ver la muestra a través de una gota de aceite. El ángulo α

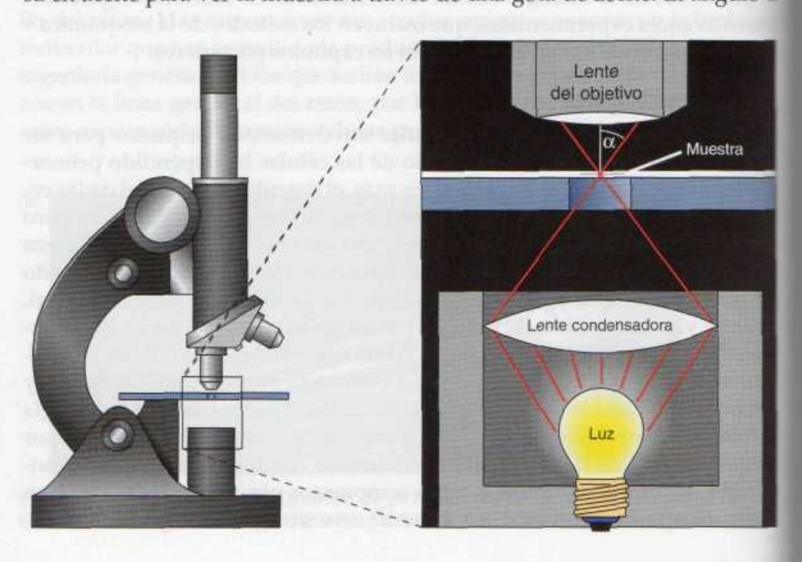


Figura 1.22 Apertura numérica. La luz se enfoca en la muestra mediante la lente condensadora y se recoge en la lente del objetivo del microscopio. La apertura numérica está determinada por el ángulo del cono de la luz que entra en el objetivo de la lente (α) y por el índice de refracción del medio (normalmente agua o aceite) entre la lente y la muestra.

corresponde a la mitad de la anchura del cono de luz recogido por la lente. El valor máximo de α es de 90°, en el que el sen $\alpha = 1$, por lo que el valor más alto de la apertura numérica es de 1,4.

El límite teórico de resolución del microscopio óptico se puede por tanto calcular de la siguiente forma:

$$\text{Resolución} = \frac{0{,}61 \times 0{,}5}{1{,}4} = 0{,}22\ \mu\text{m}$$

Los microscopios capaces de llegar a este nivel de resolución se consiguieron fabricar a finales del siglo XIX; no se pueden esperar en estos aspectos nuevas mejoras de la microscopia óptica.

Rutinariamente se utilizan diferentes tipos de microscopia óptica para estudiar varios aspectos de la estructura celular. El más simple es el **microscopio de campo luminoso**, en el que la luz pasa directamente a través de la célula y en el que la habilidad para distinguir las diferentes partes de la célula depende del contraste que se obtiene de la absorción de la luz visible por los componentes celulares. En muchos casos, las células se tiñen con tintes que reaccionan con proteínas y ácidos nucleicos para resaltar el contraste entre las diferentes partes de la célula. Antes de teñir, las muestras son normalmente tratadas con fijadores (como el alcohol, ácido acético o formaldehído) para estabilizar y conservar sus estructuras. El examen de los tejidos fijados y teñidos mediante el microscopio de campo luminoso es la práctica estándar para analizar las muestras de tejidos en los laboratorios histológicos (Fig. 1.23). Tales procedimientos de tinción matan, no obstante, a las células y por tanto no resultan apropiados para muchos experimentos en donde se desea una observación de células vivas.

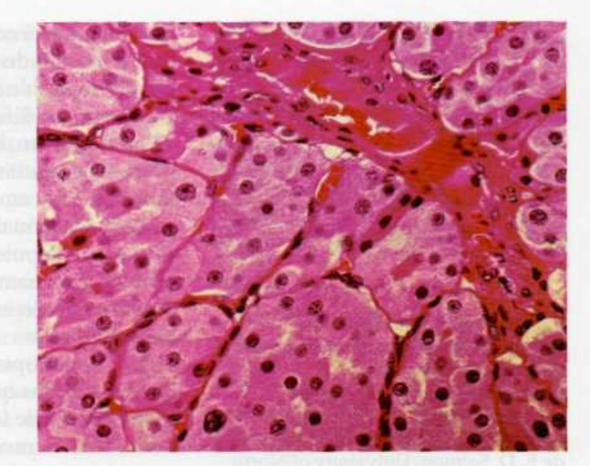


Figura 1.23 Micrografía de campo luminoso de tejido teñido. Sección de un tumor renal benigno. (G. W. Willis/ Visuals Unlimited.)

Sin la tinción, el paso directo de la luz no proporciona el contraste suficiente para distinguir muchas de las partes de la célula, limitando la utilidad del microscopio de campo luminoso. No obstante, las variaciones ópticas del microscopio óptico se pueden utilizar para potenciar el contraste entre las ondas de luz que pasan a través de regiones de la célula con diferentes densidades. Los dos métodos más comunes para la visualización de células vivas son la **microscopia de contraste de fases** y la **microscopia de interferencia-contraste diferencial** (Fig. 1.24). Los dos tipos de microscopia utilizan sistemas ópticos que convierten las variaciones de densidad o grosor entre las diferentes partes de la célula en diferencias de contraste que se pueden apreciar en la imagen final. En la microscopia de campo luminoso, las estructuras transparentes (como el núcleo) presentan poco contraste porque absorben pobremente la luz. Sin embargo, la luz disminuye cuando pasa a través de estas estructuras, por lo que su fase se altera en comparación a la luz que ha pasado a través del citoplasma que las rodea. Las microscopias de contraste de fases y de interferencia-contraste diferencial convierten estas diferencias de fase en diferencias de contraste, mejorando de ese modo las imágenes de las células vivas sin teñir.

El poder del microscopio óptico se ha extendido mediante el uso de cámaras de vídeo y ordenadores para el análisis y procesamiento de imágenes. Tales sistemas de procesamiento de imágenes pueden potenciar sus-

(A)



(B)



(C)



Figura 1.24 Observación microscópica de células vivas. Microfotografías de células bucales humanas obtenidas con (A) campo luminoso, (B) contraste de fases y (C) microscopia de interferencia-contraste diferencial. (Cortesía de Mort Abramowitz, Olympus America, Inc.)

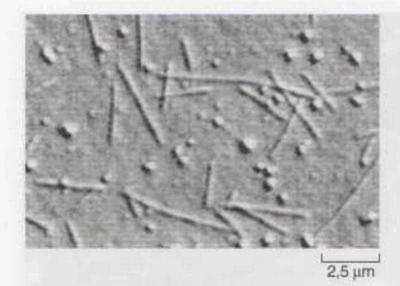


Figura 1.25 Microscopia de interferencia-contraste diferencial potenciada con vídeo. El procesamiento de una imagen electrónica permite la visualización de microtúbulos individuales. (Cortesía de E. D. Salmon, University of North Carolina, Chapel Hill.)

tancialmente el contraste de las imágenes obtenidas con el microscopio óptico, permitiendo la visualización de objetos pequeños que de otra forma no hubieran podido ser detectados. Por ejemplo, la **microscopia de interferencia-contraste diferencial-vídeo potenciada** ha permitido la visualización del movimiento de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos, que son filamentos de proteínas citoesqueléticas con un diámetro de tan solo 0,025 µm (Fig. 1.25). Sin embargo, esta potenciación no consigue llegar al límite teórico de resolución del microscopio óptico, aproximadamente 0,2 µm. Por tanto, aunque la potenciación por vídeo permite la visualización de los microtúbulos, aparecen como imágenes turbias a menos de 0,2 µm de diámetro y un microtúbulo individual no puede ser distinguido de un haz de estructuras adyacentes.

La microscopia óptica se ha llevado al nivel del análisis molecular mediante métodos que marcan moléculas específicas y que pueden ser visualizadas dentro de las células. Genes específicos o transcritos de ARN se pueden detectar mediante hibridación con sondas de ácidos nucleicos de secuencia complementaria, y las proteínas pueden detectarse usando anticuerpos apropiados (véase Cap. 4). Tanto las sondas de ácidos nucleicos como los anticuerpos se pueden señalar con variedad de marcadores que permitan su visualización en el microscopio óptico, permitiendo determinar la localización de moléculas específicas en células individuales.

La **microscopia de fluorescencia** se utiliza extensamente y es un método muy sensible para el estudio de la distribución intracelular de las moléculas (Fig. 1.26). Se utiliza una tinción fluorescente para marcar las moléculas que interesan tanto en células fijadas o vivas. La tinción fluorescente es una molécula que absorbe la luz a una longitud de onda y emite luz a una segunda longitud de onda. Esta fluorescencia se detecta mediante la iluminación de la muestra con una luz de una longitud de onda que excita al tinte fluorescente, usándose más tarde filtros apropiados para detectar la longitud de

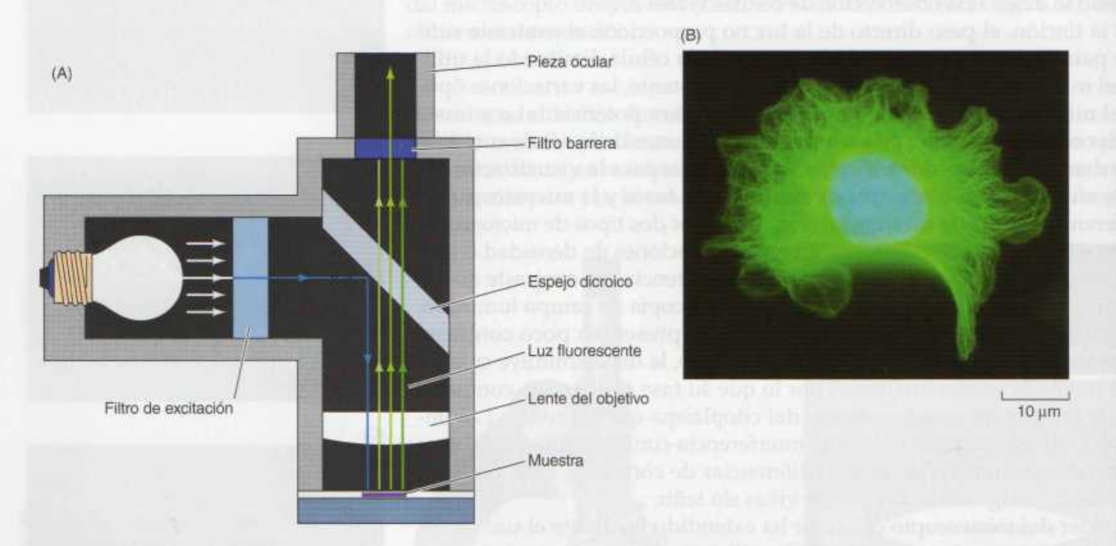


Figura 1.26 Microscopia de fluorescencia. (A) La luz pasa a través de un filtro de excitación para seleccionar la luz de la longitud de onda (p. ej., azul) que excita el tinte fluorescente. Después un espejo dicroico desvía la luz excitada hacia la muestra. La luz fluorescente emitida por la muestra (p. ej., verde) pasa a través de un espejo dicroico y un segundo filtro (el filtro barrera) para seleccionar la luz de longitud de onda emitida por el tinte. (B) Micrografía fluorescente de un pulmón de tritón en el que el ADN está teñido de azul y los microtúbulos en el citoplasma de verde. (Conly S. Rieder/Biological Photo Service.)

onda específica que emite el tinte. La microscopia fluorescente se puede utilizar para estudiar una gran variedad de moléculas dentro de las células. Una de las aplicaciones más frecuentes es la señalización de anticuerpos con tintes fluorescentes dirigidos contra una proteína específica, de manera que se pueda determinar la distribución intracelular de la proteína.

Un avance reciente importante en la microscopia de fluorescencia ha sido el empleo de la **proteína verde fluorescente (GFP:** ***green fluorescent protein*****)** de las medusas para visualizar proteínas en el interior de células vivas. La GFP puede fusionarse con cualquier proteína de interés mediante métodos estándar de ADN recombinante, y la proteína marcada con GFP puede a continuación introducirse en células y detectarse por microscopia de fluorescencia, sin necesidad de fijación y tinción de las células tal y como se necesitaría para la detección de proteínas mediante el uso de anticuerpos. Gracias a su versatilidad, el uso de GFP está muy extendido en biología celular, y se ha empleado para estudiar la localización de una amplia gama de proteínas en el interior de células vivas (Fig. 1.27). Muchas proteínas fluorescentes relacionadas con emisiones azules, amarillas o rojas también se encuentran disponibles, expandiendo aún más la utilidad de esta técnica.

Se han desarrollado una variedad de métodos para seguir el movimiento y las interacciones de proteínas marcadas con GFP en el interior de células vivas. Un método ampliamente utilizado para estudiar los movimientos de proteínas marcadas con GFP es la **recuperación de fluorescencia tras el fotoblanqueado (FRAP:** ***fluorescente recovery after photobleaching*****)** (Fig. 1.28). En esta técnica, una región de interés en una célula que expresa una proteína marcada con GFP es blanqueada mediante la exposición a una luz de alta intensidad. La fluorescencia se recupera a lo largo del tiempo debido al movimiento de moléculas marcadas con GFP no blanqueadas hacia la región blanqueada, permitiendo determinar la tasa a la que la proteína se mueve en el interior de la célula.

Las interacciones de dos proteínas entre sí en el interior de una célula pueden analizarse mediante una técnica denominada **transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET:** ***fluorescence resonance energy***

■ **Los nanocristales semiconductores (denominados puntos cuánticos) se emplean cada vez más en lugar de los marcadores fluorescentes en muchas aplicaciones dentro de la microscopia de fluorescencia. Los puntos cuánticos fluorecen con mayor intensidad y son más estables que los marcadores fluorescentes tradicionales.**

■ **La GFP se deriva de la medusa del Pacífico *Aequoria victoria*. Las proteínas que fluorecen en diferentes colores han sido aisladas a partir de otros organismos marinos.**

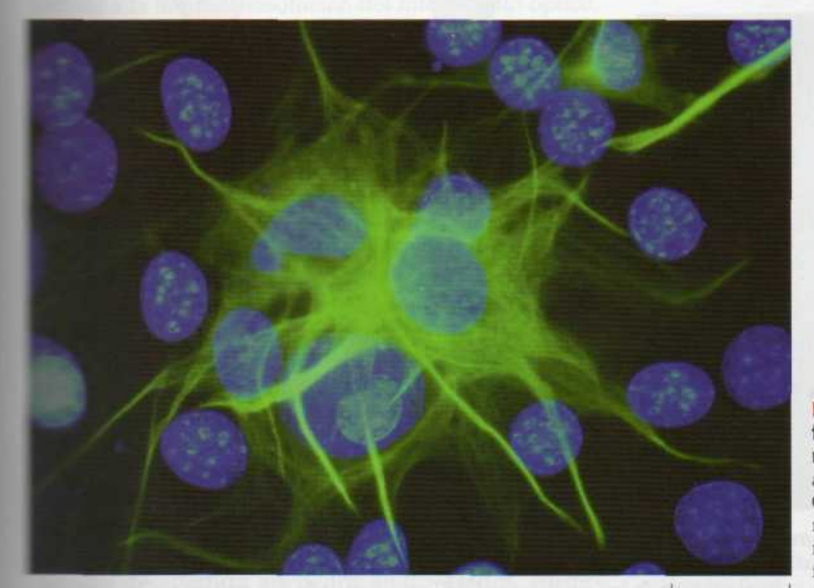


Figura 1.27 Microscopia de fluorescencia de una proteína marcada con GFP. Una proteína asociada a microtúbulos fusionada con GFP fue introducida en neuronas murinas en cultivo y visualizada mediante microscopia de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron de azul. (De A. Cariboni, 2004. *Nature Cell Biol.* 6:929.)

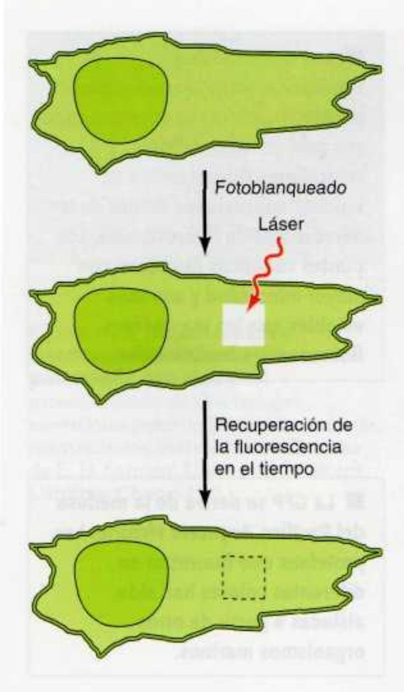


Figura 1.28 Recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueado (FRAP). Una región de una célula que expresa una proteína marcada con GFP es blanqueada mediante láser. La recuperación de la fluorescencia a lo largo del tiempo a medida que moléculas marcadas con GFP no blanqueado difunden hacia la región blanqueada. La tasa de recuperación de la fluorescencia proporciona, por tanto, una medida de la tasa de movimiento de proteína en el interior celular.

transfer) (Fig. 1.29). En los experimentos FRET, las dos proteínas de interés se unen a diferentes marcadores fluorescentes, como dos variantes de la GFP. Las variantes de GFP son seleccionadas para absorber y emitir luz de diferentes longitudes de onda, de forma que la luz emitida por una de las variantes GFP excita a la segunda. La interacción entre dos proteínas puede entonces detectarse, mediante la iluminación de la célula con una luz de longitud de onda que excita la primera variante de GFP y analizar la longitud de onda de la luz emitida. Si las proteínas unidas a estas variantes de GFP interaccionan en el interior de la célula, las moléculas fluorescentes se encontrarán cerca y la luz emitida por la primera variante GFP excitará a la segunda variante, dando como resultado la emisión de una luz de longitud de onda característica de la segunda variante GFP.

Las imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia convencional son borrosas como consecuencia de la fluorescencia no enfocada. Estas imágenes pueden ser mejoradas mediante un tratamiento informático denominado desconvolución de imágenes, en el que un ordenador analiza las imágenes obtenidas de diferentes profundidades de foco y genera una imagen más nítida como cabría esperar a partir de un único punto focal. Alternativamente, la **microscopia confocal** permite la obtención de imágenes de contraste y detalle incrementados, mediante el análisis de la fluorescencia de un solo punto de la muestra. Un pequeño punto de luz, normalmente

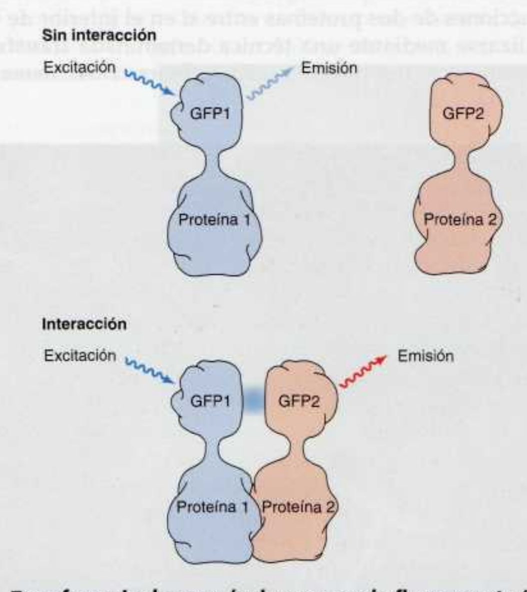


Figura 1.29 Transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Se fusionan dos proteínas a dos variantes diferentes de la GFP (GFP1 y GFP2) con distintas longitudes de onda para la excitación y la emisión, seleccionadas de tal forma que la luz emitida por GFP1 excita a GFP2. A continuación, las células son iluminadas con una luz de longitud de onda tal que excita a GFP1. Si las proteínas no *interaccionan, la luz emitida por GFP1 será detectada. Sin embargo, si las proteínas* sí interaccionan, GFP1 excitará a GFP2, y la luz emitida por GFP2 será detectada.

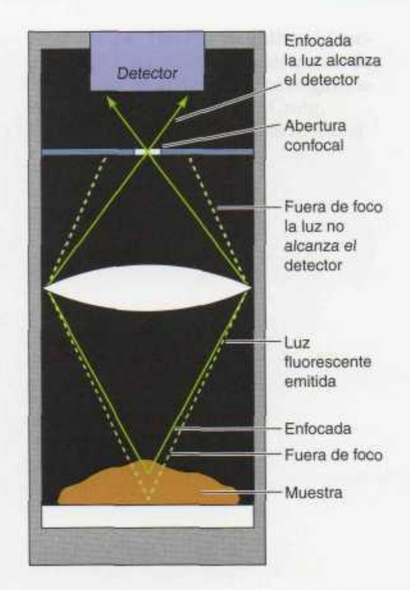


Figura 1.30 Microscopia confocal. Un punto de luz es enfocado en la muestra a una distancia determinada, y la luz fluorescente emitida se recoge en un detector. Antes de alcanzar el detector, la luz fluorescente emitida por la muestra debe pasar a través de una apertura confocal situada en el punto en que la luz emitida desde la distancia elegida de la muestra se enfoca. Como resultado, solamente se detecta la luz enfocada emitida desde la distancia elegida de la muestra.

producido por un láser, se enfoca en la muestra a una profundidad determinada. La luz fluorescente emitida se recoge utilizando un detector, como una videocámara. Antes de que la luz emitida alcance el detector, ésta debe atravesar el agujero de una aguja (llamado apertura focal) situada precisamente en el punto donde la luz emitida desde la profundidad elegida de la muestra es enfocada (Fig. 1.30). Por tanto, solamente la luz emitida desde el plano de enfoque es capaz de alcanzar el detector. El barrido a lo largo de la muestra genera una imagen del plano de enfoque en dos dimensiones, una imagen mucho más detallada que la obtenida con la microscopia fluorescente habitual (Fig. 1.31). Además, es posible fundir una serie de imágenes obtenidas a distintas profundidades para reconstruir una imagen tridimensional de la muestra.

La **microscopia de excitación multifotónica** es una alternativa a la microscopia tridimensional que también puede aplicarse a las células vivas. La muestra se ilumina con una luz de una longitud de onda tal que la excitación del tinte fluorescente requiera la absorción simultánea de dos o más fotones (Fig 1.32). La probabilidad de que los dos fotones exciten simultáneamente al tinte fluorescente solamente es importante en el punto de la muestra en el que el láser está enfocado, de tal manera que la fluorescencia sólo se emite desde el plano de enfoque de la luz. Esta potente excitación proporciona automáticamente una solución tridimensional, sin necesidad de que la luz emitida atraviese la apertura de una aguja, como en la microscopía confocal. Además, la localización de la excitación reduce el daño de la muestra, permitiendo imágenes tridimensionales de células vivas.

Microscopia electrónica

Debido a la limitada resolución del microscopio óptico, el análisis de los detalles de la estructura celular ha necesitado una técnica de microscopia mucho más poderosa, llamada microscopia electrónica, que fue desarrollada en los años 1930 y aplicada por primera vez a muestras biológicas por Albert Claude, Keith Porter y George Palade en los años 1940 y 1950. El microscopio electrónico puede alcanzar una resolución mucho mayor que la obtenida con el microscopio óptico puesto que la longitud de onda de los electrones es menor que la de la luz. La longitud de onda de los electrones en un microscopio electrónico puede ser de hasta 0,004 nm —alrededor de 100.000 veces más corta que la longitud de onda de la luz visible—. Teóricamente, esta longitud de onda puede alcanzar una resolución de 0,002 nm, pero tal resolución no ha podido obtenerse en la práctica, puesto que no solo está determinada por la longitud de onda sino también por la apertura numérica de la lente del microscopio. La apertura numérica es un factor limitante para la microscopia electrónica puesto que las propiedades inherentes de las lentes electromagnéticas limitan sus ángulos de apertura alrededor de 0,5 grados, correspondientes a aberturas numéricas de solo 0,01. Por tanto,

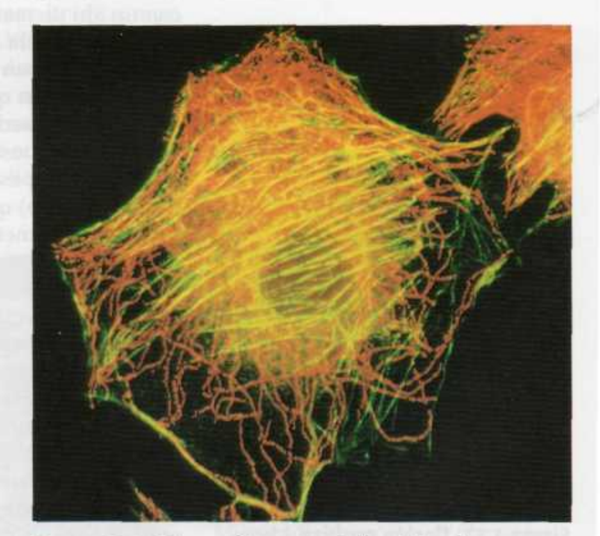


Figura 1.31 Micrografía confocal de células humanas. Microtúbulos y filamentos de actina aparecen teñidos con colorantes fluorescentes rojo y verde, respectivamente. (K. G. Murti/Visuals Unlimited.)

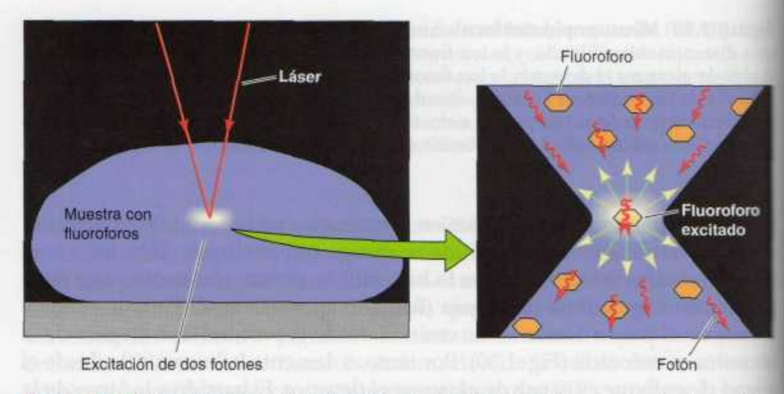


Figura 1.32 Microscopia por excitación de dos fotones. Se requiere la absorción simultánea de dos fotones para excitar el tinte fluorescente. Esto sólo sucede en el punto de la muestra donde se enfoca la luz, de tal forma que la luz fluorescente sólo se emite desde la distancia elegida de la muestra.

bajo condiciones óptimas, el poder de resolución del microscopio electrónico es aproximadamente de 0,2 nm. Además, la resolución que se puede obtener con muestras biológicas está limitada por la falta de contraste inherente. En consecuencia, en muestras biológicas el límite práctico de resolución para el microscopio electrónico es desde 1 a 2 nm. Aunque esta resolución es mucho menor que la predicha por la longitud de onda de los electrones, *representa una mejora de más de cien veces del poder de resolución del microscopio óptico.*

En el estudio de las células se utilizan dos tipos de microscopia electrónica —transmisión y barrido—. En principio, la **microscopia electrónica de transmisión** es similar a la observación de células teñidas con sales de metales pesados, que proporcionan contraste mediante los electrones dispersos. Un haz de electrones pasa a través de la muestra y se enfoca para formar una imagen en una pantalla fluorescente. Los electrones que chocan con un ión de metal pesado cuando pasan por las muestra se reflejan y no contribuyen a la imagen final, de tal forma que las zonas teñidas de la muestra aparecen oscuras.

Las muestras que se van a analizar por microscopia de transmisión de electrones se pueden preparar con tintes positivos o negativos. En la tinción positiva, las muestras de tejido se cortan en secciones finas y se tiñen con sales de metales pesados (como el tetróxido de osmio, acetato de uranilo y citrato de plomo) que reaccionan con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Estos iones de metales pesados se unen a gran variedad de estructuras celulares, que aparecen oscuras en la imagen final (Fig. 1.33). Los procedimientos de tinción positiva también se pueden utilizar para identificar macromoléculas específicas dentro de las células. Por ejemplo, los anticuerpos marcados con metales pesados densos en electrones (como partículas de oro) se utilizan con frecuencia para determinar la localización subcelular de proteínas específicas con el microscopio electrónico. Este método es similar al uso de anticuerpos marcados con tintes fluorescentes en la microscopia fluorescente. Las vistas tridimensionales de estructuras con resoluciones de 2-10 nm también pueden obtenerse empleando la técnica de **tomografía electrónica**, que genera imágenes tridimensionales mediante análisis informático de múltiples imágenes bidimensionales obtenidas a partir de una gama de vistas desde distintas direcciones.

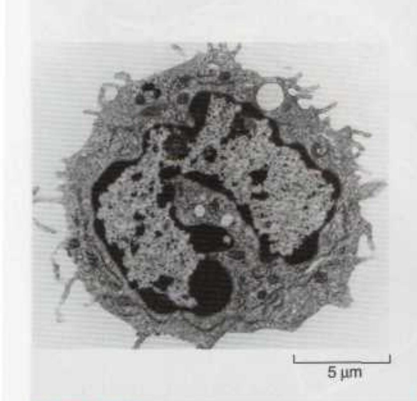


Figura 1.33 Tinción positiva. Micrografía de transmisión de electrones de un glóbulo blanco teñido positivamente. (Don W. Fawcet/Visuals Unlimited.)

La tinción negativa resulta útil para la visualización de estructuras biológicas intactas, como las bacterias, los orgánulos subcelulares aislados, y ma-

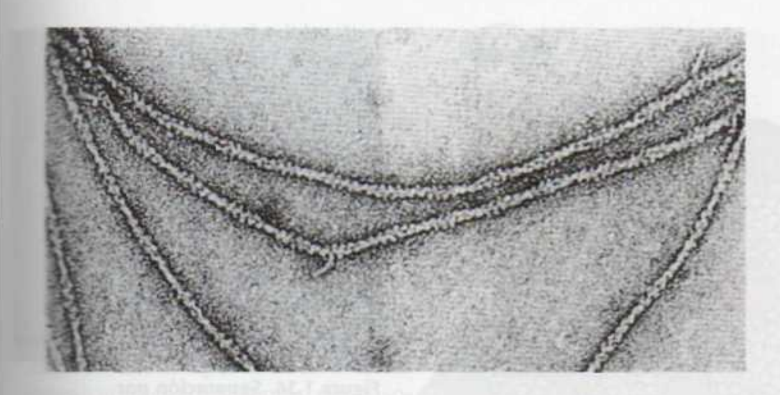


Figura 1.34 Tinción negativa. Micrografía de transmisión de electrones de filamentos de actina teñidos negativamente. (Cortesía de Roger Craig, University of Massachusetts Medical Center.)

cromoléculas (Fig. 1.34). En este método, la muestra biológica se deposita en una lámina, permitiendo que una gota de metal pesado rodee su superficie. La muestra sin teñir se rodea con una lámina densa en electrones, produciendo una imagen en la que la muestra aparece clara en contra de un fondo oscuro.

El **sombreado de metal** es otra técnica que se utiliza para visualizar la superficie de estructuras subcelulares aisladas o macromoléculas en el microscopio de transmisión de electrones (Fig. 1.35). La muestra se cubre con una fina capa de metal evaporado, como el platino. Se pulveriza el metal en la muestra desde un determinado ángulo, de tal manera que las superficies de la muestra que se encuentran de frente al pulverizador de moléculas de metal evaporadas se cubren más que las otras. Esta diferencia de envoltura crea un efecto de sombra, dando a la muestra una apariencia tridimensional en las micrografías electrónicas.

La preparación de las muestras mediante la **separación por congelación o criofractura**, en combinación con el sombrado de metal, ha resultado particularmente importante en los estudios de la estructura de la membrana. Las muestras se congelan en nitrógeno líquido (a –196 °C) y se separan con el filo de un bisturí. El proceso con frecuencia separa la bicapa lipídica, mostrando las caras interiores de la membrana celular (Fig. 1.36). La muestra se sombrea más tarde con platino, y el material biológico se disuelve en ácido, produciéndose una réplica de metal de la superficie de la muestra. El examen de tales réplicas en el microscopio electrónico revela muchas alteraciones de la superficie, que corresponden a las proteínas que ocupan la bicapa lipídica. Una variación de la separación por congelación llamada grabado

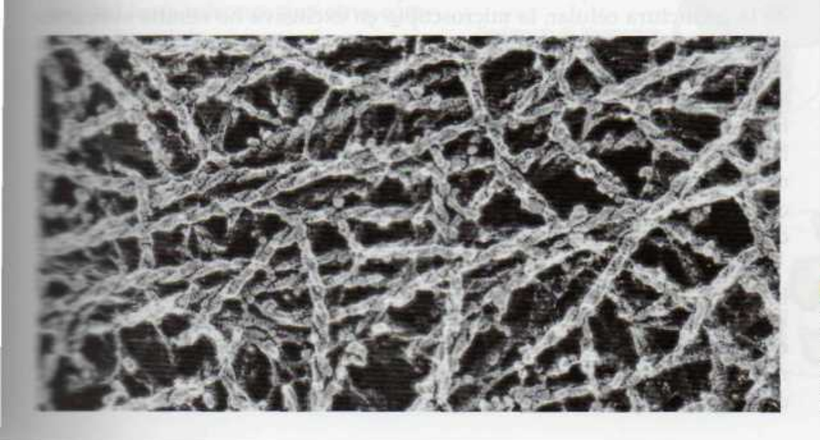


Figura 1.35 Sombreado de metal. Micrografía electrónica de filamentos de actina/miosina del citoesqueleto preparada mediante sombreado de metal. (Don W. Fawcett, J. Heuser/Photo Researchers, Inc.)

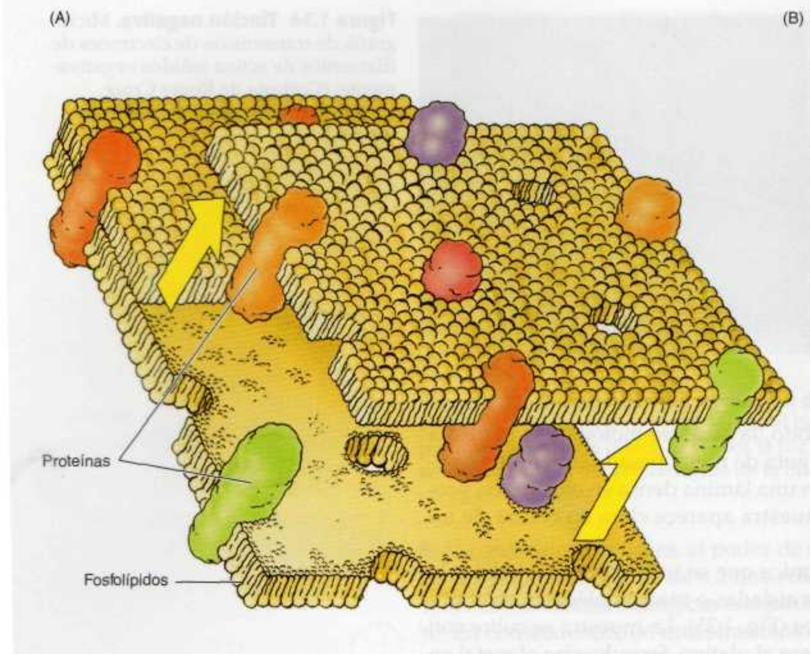




Figura 1.36 Separación por congelación. (A) La separación por congelación divide la bicapa lipídica, dejando las proteínas embebidas en la membrana asociadas a una de las dos partes de la membrana. (B) Micrografía de las membranas plasmáticas de dos células adyacentes separadas por congelación. Las proteínas que cubren la bicapa aparecen como partículas intermembranosas (flecha). (Don W. Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

1.1 Animación web

Fraccionamiento celular

Una vez rotas las células por sonicación, sus constituyentes subcelulares son fraccionados mediante diferentes tipos de centrifugación.

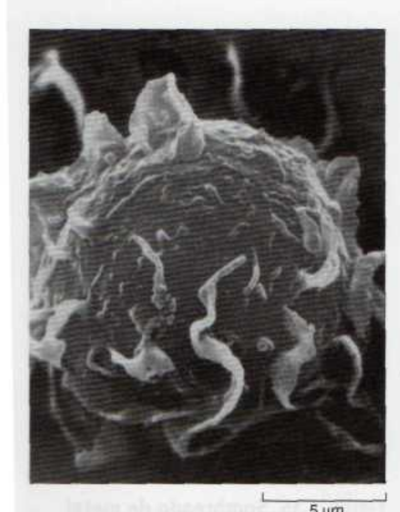


Figura 1.37 Microscopia electrónica de barrido. Micrografía electrónica de barrido de un macrófago. (David Phillips/Visuals Unlimited.)

por congelación permite la observación de las superficies externas de las membranas celulares además de sus caras internas.

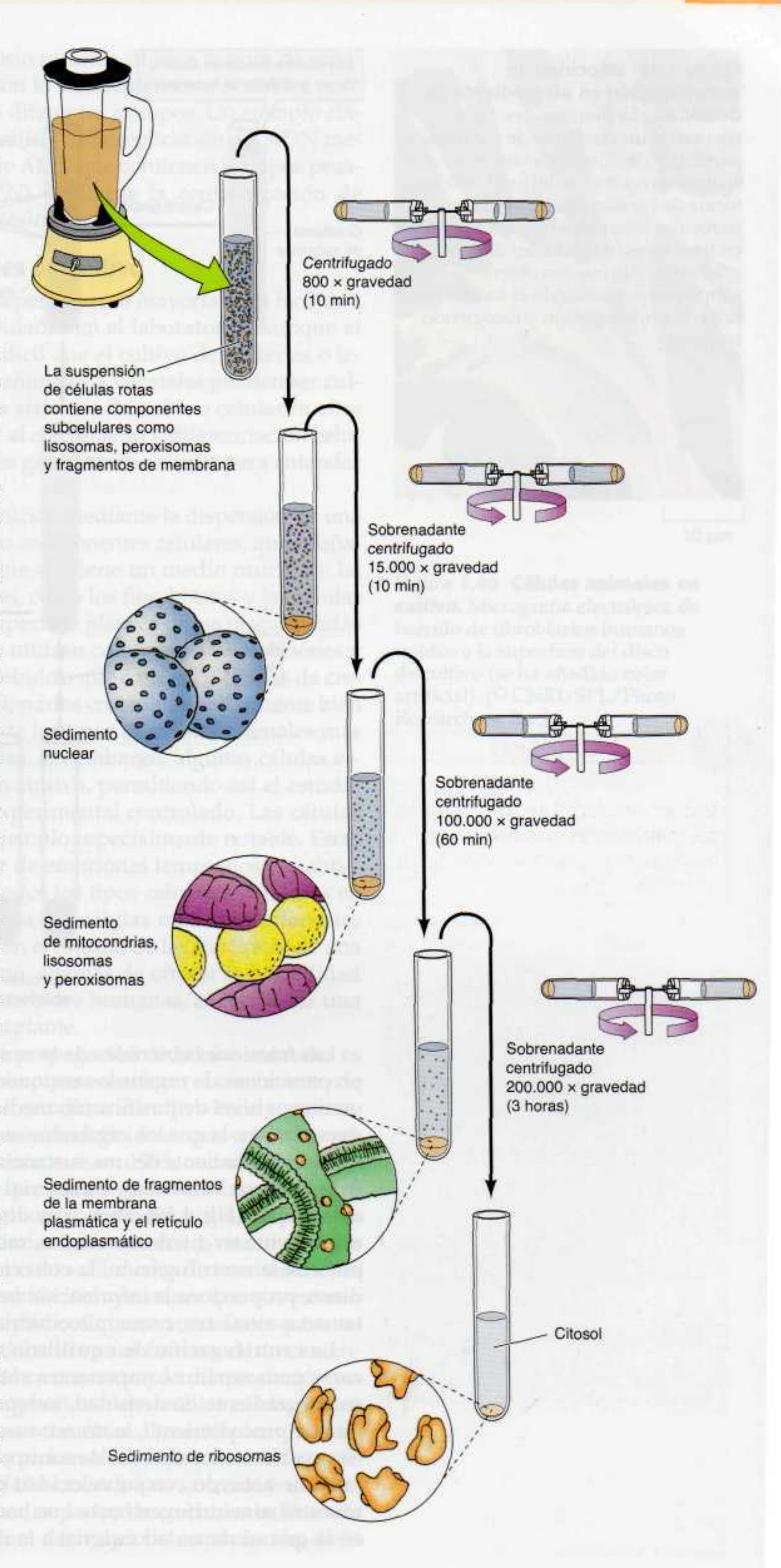
El segundo tipo de microscopia electrónica, la **microscopia electrónica de barrido**, se utiliza para obtener una imagen tridimensional de las células (Fig. 1.37). En la microscopia electrónica de barrido el haz de electrones no pasa a través de la muestra. En su lugar, la superficie de la célula se recubre de un metal pesado, y se utiliza un haz de electrones que barre toda la muestra. Los electrones aislados o emitidos por la superficie de la muestra se recogen para generar una imagen tridimensional a la vez que el haz de electrones se mueve a lo largo de la célula. Debido a que la resolución de la microscopia electrónica de barrido solo es de unos 10 nm, su uso está restringido al estudio de células completas en lugar de suborgánulos celulares o macromoléculas.

Separación subcelular

Aunque el microscopio electrónico ha permitido una observación detallada de la estructura celular, la microscopia en exclusiva no resulta suficiente para definir las funciones de los numerosos componentes de las células eucariotas. Para contestar muchas de las preguntas que atañen a la función de los orgánulos celulares, ha sido necesario aislar a los orgánulos de las células eucariotas de forma que puedan utilizarse para estudios bioquímicos. Normalmente, esto se realiza mediante la **centrifugación diferencial** —un método desarrollado por Albert Claude, Christian de Duve y sus colaboradores en los años 1940 y 1950 para separar los componentes de las células de acuerdo con sus tamaños y densidades.

El primer paso en la separación subcelular es la rotura de la membrana plasmática bajo condiciones que no destruyan los componentes internos de la célula. Se utilizan diferentes métodos, que incluyen la sonicación (exposición a sonidos de alta frecuencia), reducción en un homogeneizador mecánico, o el tratamiento con una batidora de alta velocidad. Todos estos procedimientos rompen la membrana plasmática y el retículo endoplasmático en

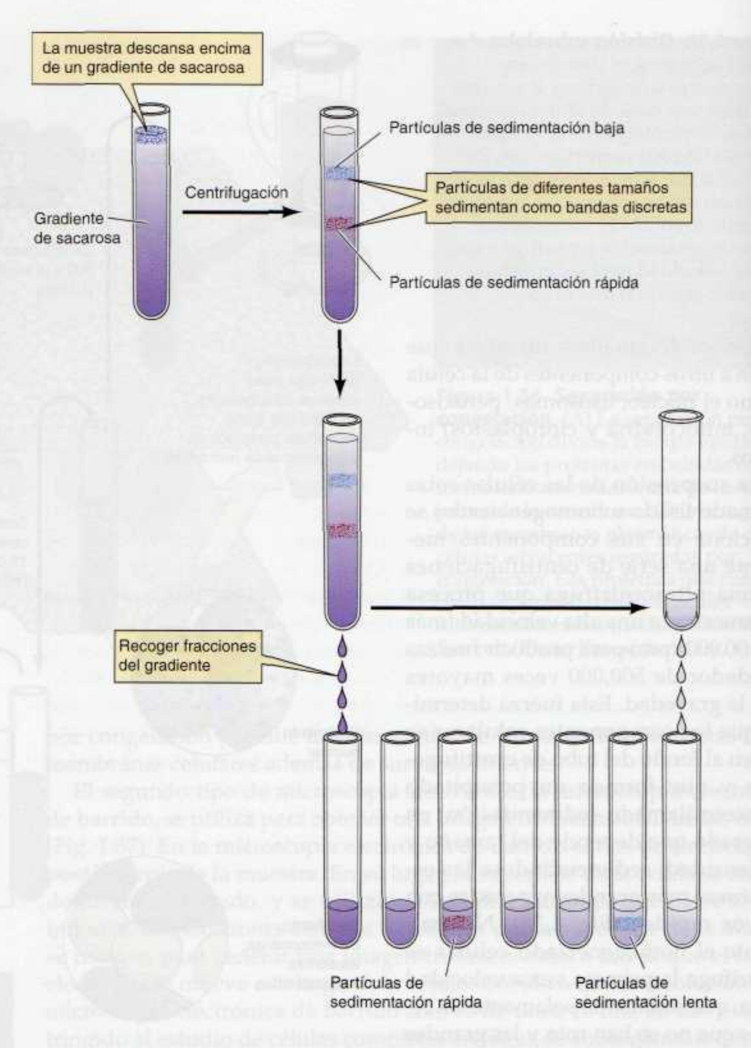
Figura 1.38 **División subcelular.** Las células se disgregan (lisan) y los componentes subcelulares se separan mediante una serie de centrifugaciones que van aumentando de velocidad. Después de cada centrifugación, los orgánulos que han sedimentado en el fondo del tubo se recogen en forma de precipitado sólido. El sobrenadante (solución restante) se centrifuga a una mayor velocidad para sedimentar el siguiente orgánulo más grande.



pequeños fragmentos mientras que dejan a otros componentes de la célula (como el núcleo, lisosomas, peroxisomas, mitocondria y cloroplastos) intactos.

La suspensión de las células rotas (llamado lisado u homogeneizado) se fracciona en sus componentes mediante una serie de centrifugaciones en una **ultracentrífuga** que procesa las muestras a una alta velocidad (más de 100.000 rpm) para producir fuerzas alrededor de 500.000 veces mayores que la gravedad. Esta fuerza determina que los componentes celulares se sitúen al fondo del tubo de centrifugación y que formen un precipitado (proceso llamado sedimentación) en un grado que depende del tamaño y la densidad, sedimentándose las estructuras más grandes y pesadas con mayor rapidez (Fig. 1.38). Normalmente el homogeneizado celular se centrifuga la primera vez a velocidad lenta, que sedimenta solamente las células que no se han roto y las grandes estructuras celulares —los núcleos—. Por tanto, se puede obtener una fracción rica en núcleos del precipitado que se forma en la centrifugación a velocidad lenta mientras que otros componentes celulares continúan suspendidos en el sobrenadante (el resto de la solución). El sobrenadante se centrifuga después a velocidad rápida para sedimentar mitocondrias, cloroplastos, lisosomas y peroxisomas. La recentrifugación del sobrenadante a gran velocidad sedimenta fragmentos de la membrana plasmática y del retículo endoplasmático. Una cuarta centrifugación a gran velocidad sedimenta ribosomas, dejando exclusivamente la porción soluble del citoplasma (el citosol) en el sobrenadante.

Figura 1.39 Velocidad de centrifugación en un gradiente de densidad. La muestra descansa encima de un gradiente de sacarosa, y partículas de diferentes tamaños sedimentan a través del gradiente en forma de bandas discretas. Las partículas separadas pueden recogerse en fracciones individuales del gradiente, que pueden obtenerse simplemente punzando el fondo del tubo de centrifugación y recogiendo las gotas.



Las fracciones obtenidas de la centrifugación diferencial corresponden a preparaciones de orgánulos enriquecidas, pero no puras. Se puede obtener un mayor nivel de purificación mediante la **centrifugación en gradiente de densidad**, en la que los orgánulos se separan mediante la sedimentación en función al gradiente de una sustancia densa, como la sacarosa. En la **centrifugación por velocidad**, el material primario se estratifica en el gradiente de sacarosa (Fig. 1.39). Partículas de diferentes tamaños se sedimentan por el gradiente en diferentes escalas, moviéndose como bandas discretas. Después de la centrifugación, la colección de fracciones individuales del gradiente proporciona la información necesaria para separar a los orgánulos de tamaños similares, como mitocondrias, lisosomas y peroxisomas.

La **centrifugación de equilibrio** en gradiente de densidad puede utilizarse para separar componentes subcelulares en función de su migración en un gradiente de densidad, independientemente de su tamaño y forma. En este procedimiento, la muestra se centrifuga en un gradiente que contiene una alta concentración de sacarosa o cloruro de cesio. En lugar de separarse de acuerdo con su velocidad de sedimentación, las partículas de la muestra se centrifugan hasta que han alcanzado una posición de equilibrio en la que su densidad es igual a la de la solución de sacarosa o cloruro de

cesio. Estas centrifugaciones de equilibrio resultan útiles a la hora de separar diferentes tipos de membranas y son lo suficientemente sensibles para separar macromoléculas marcadas con diferentes isótopos. Un ejemplo clásico, discutido en el Capítulo 4, es el análisis de la replicación del ADN mediante la separación de las moléculas de ADN que contienen isótopos pesados y ligeros de nitrógeno (^{15}N y ^{14}N) mediante la centrifugación de equilibrio en gradientes de cloruro de cesio.



Figura 1.40 Células animales en cultivo. Micrografía electrónica de barrido de fibroblastos humanos unidos a la superficie del disco de cultivo (se ha añadido color artificial). (© CNRI/SPL/Photo Researchers, Inc.)

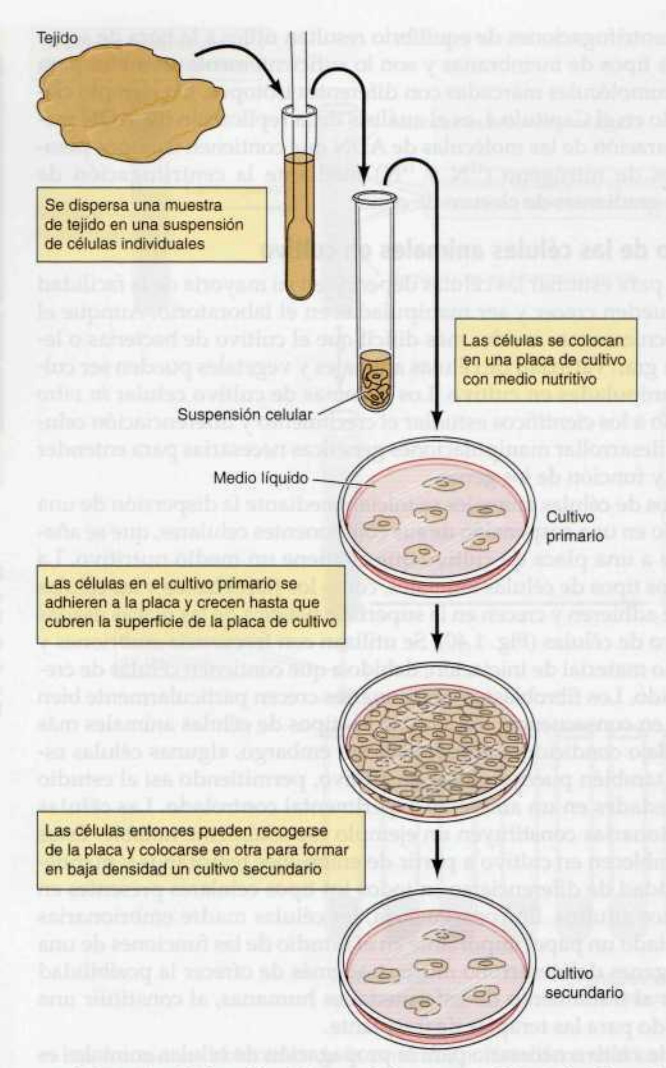
Crecimiento de las células animales en cultivo

La habilidad para estudiar las células depende en su mayoría de la facilidad con la que pueden crecer y ser manipuladas en el laboratorio. Aunque el proceso es técnicamente mucho más difícil que el cultivo de bacterias o levaduras, una gran variedad de células animales y vegetales pueden ser cultivadas y manipuladas en cultivo. Los sistemas de cultivo celular *in vitro* han permitido a los científicos estudiar el crecimiento y diferenciación celular, así como desarrollar manipulaciones genéticas necesarias para entender la estructura y función de los genes.

Los cultivos de células animales se inician mediante la dispersión de una parte de tejido en una suspensión de sus componentes celulares, que se añade más tarde a una placa de cultivo que contiene un medio nutritivo. La mayoría de los tipos de células animales, como los fibroblastos y las células epiteliales, se adhieren y crecen en la superficie plástica de las placas usadas para el cultivo de células (Fig. 1.40). Se utilizan con frecuencia embriones y tumores como material de iniciación, debido a que contienen células de crecimiento rápido. Los fibroblastos embrionarios crecen particularmente bien en cultivo, y en consecuencia son uno de los tipos de células animales más estudiados. Bajo condiciones apropiadas, sin embargo, algunas células especializadas también pueden crecer en cultivo, permitiendo así el estudio de sus propiedades en un ambiente experimental controlado. Las **células madre embrionarias** constituyen un ejemplo especialmente notable. Estas células se establecen en cultivo a partir de embriones tempranos y mantienen su capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares presentes en los organismos adultos. En consecuencia, las células madre embrionarias han representado un papel importante en el estudio de las funciones de una variedad de genes del desarrollo murino, además de ofrecer la posibilidad de contribuir al tratamiento de enfermedades humanas, al constituir una fuente de tejido para las terapias de trasplante.

El medio de cultivo necesario para la propagación de células animales es mucho más complejo que el medio mínimo para sustentar el crecimiento de las bacterias y levaduras. Los primeros estudios de cultivo celular utilizaban un medio que consistía en componentes indefinidos, como plasma, suero y extractos embrionarios. Se avanzó aún más en 1955, cuando Harry Eagle describió el primer medio definido que sustentaba el crecimiento de las células animales. Además de sales y glucosa, el medio utilizado para los cultivos de células animales contiene varios aminoácidos y vitaminas, que las células no pueden producir por sí mismas. El medio de crecimiento de muchas células animales en cultivo también incluye suero, que sirve como fuente de factores de crecimiento polipeptídicos que son necesarios para estimular la división celular. Se han identificado varios factores de crecimiento. Actúan como reguladores críticos del crecimiento y la diferenciación celular en organismos multicelulares, proporcionando señales mediante las que diferentes células se comunican unas con otras. Por ejemplo, una función importante de los fibroblastos de la piel en el animal intacto es la proliferación cuando se necesita reparar el daño causado por un corte o una herida. Su división está desencadenada por un factor de crecimiento liberado por las plaquetas durante la coagulación, derivando la estimulación de la

Figura 1.41 Cultivo de células animales. Las células procedentes de un tejido se cultivan en medio nutritivo en placas Petri.



proliferación de los fibroblastos del entorno del tejido dañado. La identificación de los factores de crecimiento individuales ha hecho posible el cultivo de una variedad de células en un medio libre de suero (medio en el que el suero ha sido reemplazado por factores de crecimiento específicos necesarios para la proliferación de las células en cuestión).

Los cultivos iniciales de células establecidos a partir de un tejido se denominan **cultivos primarios** (Fig. 1.41). Las células en un cultivo primario normalmente crecen hasta cubrir la superficie de la placa de cultivo. Después pueden ser retiradas de la placa y reponerse a baja densidad para formar cultivos secundarios. Este proceso se puede repetir muchas veces, aunque la mayoría de las células normales no pueden crecer en cultivo indefinidamente. Por ejemplo, los fibroblastos humanos normales admiten desde 50 a 100 duplicaciones de la población, después de las cuales paran de crecer y mueren. Por el contrario, las células que se derivan de tumores con frecuencia proliferan indefinidamente en cultivo y reciben el nombre de **líneas celulares inmortales**. Además, se ha conseguido aislar un importante número de líneas celulares inmortalizadas de roedores procedentes de cultivos de fibroblastos normales. En lugar de morir como la mayoría de sus homólogos,





EXPERIMENTO CLAVE

Cultivo celular animal

Requisitos nutritivos de las células de mamíferos en cultivos de tejidos

Harry Eagle
National Institutes of Health, Bethesda, MD
Science, Volumen 122, 1955, págs. 501-504



Harry Eagle

Contexto

Los primeros cultivos celulares se basaban en el crecimiento celular a partir de fragmentos de tejido que estaban embebidos en coágulos de plasma, un sistema de cultivo que estaba lejos de ser adecuado para el análisis experimental. A finales de los años 1940, uno de los mayores avances fue establecer líneas celulares que crecían a partir de células aisladas adheridas a la superficie de las placas de cultivo. Pero estas células seguían creciendo en un medio indefinido que consistía en diversas combinaciones de suero y extractos embrionarios. Por ejemplo, una de las líneas cancerígenas humanas más utilizadas (llamada células HeLa) se estableció por primera vez en 1952 mediante su crecimiento en un medio que consistía en plasma de pollo, extractos de embrión ovino, y suero del cordón umbilical humano. El uso de tal complejo y el medio de cultivo indefinido hicieron imposible el análisis de las necesidades específicas de crecimiento de las células animales. Harry Eagle fue el primero en resolver este problema, llevando a cabo un análisis sistemático de los nutrientes necesarios para sustentar el crecimiento de las células animales en cultivo.

Experimentos

Eagle estudió el crecimiento de dos líneas celulares preestablecidas: las células HeLa y una línea de fibroblastos del ratón llamada células L. Fue capaz de hacer crecer a estas células en un medio compuesto por una mezcla de sales, carbohidratos, aminoácidos y vitaminas, y un suplemento de proteínas séricas. Mediante la variación sistemática de los componentes del medio, Eagle fue capaz de determinar los nutrientes específicos necesarios para el crecimiento celular. Además de sales y glucosa, estos nutrientes incluyen 13 aminoácidos y diversas vitaminas. También resultaron necesarias una pequeña cantidad de proteínas séricas. El medio básico desarrollado por Eagle está descrito en la siguiente tabla, reproducida de su ensayo de 1955.

Impacto

El medio descrito por Eagle todavía resulta el medio básico utilizado hoy en día para los cultivos de células animales. Su uso ha permitido a los investigadores el crecimiento de una basta variedad de células bajo condiciones experimentales definidas, las cuales han sido críticas para el estudio del crecimiento y la diferenciación de las células animales, incluyendo la identificación de los factores de crecimiento presentes en el suero —ahora se incluyen polipéptidos que controlan el comportamiento de las células individuales dentro del animal intacto.

Tabla 4. Medio básico para el cultivo de la célula HeLa y de los fibroblastos de ratón (*10*)

L-aminoácidos* (m*M*)		Vitaminas‡ (m*M*)		Diversos	
Arginina	0,1	Biotina	10^{-3}	Glucosa	5 m*M*§
Cisteína	0,05 (0,02)†	Colina	10^{-3}	Penicilina	0,005%#
Glutamina	2,0 (1,0)‖	Ácido fólico	10^{-3}	Estreptomicina	0,005%#
Histidina	0,05 (0,02)†	Nicotinamida	10^{-3}	Rojo fenol	0,0005%#
Isoleucina	0,2	Ácido pantoténico	10^{-3}		
Leucina	0,2 (0,1)†	Piridoxal	10^{-3}	Para estudios de nutrición celular	
Lisina	0,2 (0,1)†	Tiamina	10^{-3}	Diálisis suero de caballo, 1%†	
Metionina	0,05	Riboflavina	10^{-4}	Diálisis suero humano, 5%	
Fenilalanina	0,1 (0,05)†	Sales (n*M*)§		Para cultivos de cantidad	
Treonina	0,2 (0,1)†	NaCl	100	Suero de caballo completo, 5%†	
Triptófano	0,02 (0,01)†	KCl	5	Suero humano completo, 10%	
Tirosina	0,1	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1		
Valina	0,2 (0,1)†	$NaHCO_3$	20		
		$CaCl_2$	1		
		$MgCl_2$	0,5		

* Es conveniente guardarlo en el refrigerador como una solución única que contiene 20 veces la concentración indicada de cada aminoácido.

† Para el fibroblasto de ratón.

‡ Es conveniente guardarlo como una solución única que contenga 100 o 1.000 veces la concentración indicada de cada vitamina; mantener congelado.

§ Es conveniente guardarlo en el refrigerador en dos soluciones, una que contenga NaCl, KCl, NaH_2PO_4, $NaHCO_3$ y glucosa diez veces la concentración indicada para cada una, y la segunda que contenga $CaCl_2$ y $MgCl_2$, 20 veces la concentración indicada.

‖ Es conveniente guardarlo como una solución 100 m*M*; congelado cuando no se use.

\# Es conveniente guardarlo como una solución única que contenga 100 veces la concentración indicada de penicilina, estreptomicina y rojo fenol.



Figura 1.42 Células vegetales en cultivo. Una masa indiferenciada de células vegetales (un callo) creciendo en un medio sólido. (John N. A. Lott/Biological Photo Service.)

algunas células de estos cultivos continúan proliferando indefinidamente, formando líneas celulares como aquellas que se derivan de los tumores. Tales líneas celulares permanentes han resultado muy útiles para muchos tipos de experimentos ya que proporcionan una fuente continua y uniforme de células que pueden ser manipuladas, clonadas y cultivadas indefinidamente en el laboratorio.

Incluso bajo condiciones óptimas, el tiempo de división de la mayoría de las células animales que crecen activamente es del orden de 20 horas —diez veces más largo que el tiempo de división de las levaduras—. Por tanto, los experimentos con células animales cultivadas son mucho más difíciles y más largos que aquellos con bacterias y levaduras. Por ejemplo, el crecimiento de una colonia visible de células animales a partir de una sola célula dura una semana o más, mientras que las colonias de *E. coli* o de levaduras se desarrollan durante una noche. No obstante, las manipulaciones genéticas de las células animales en cultivo resultan indispensables para el entendimiento de la estructura y función de la célula.

Cultivo de células vegetales

Las células vegetales también pueden ser cultivadas en un medio nutritivo que contenga las moléculas apropiadas para la regulación del crecimiento. Al contrario que los factores de crecimiento polipeptídicos que regulan la proliferación de la mayoría de las células animales, los reguladores del crecimiento de las células vegetales son pequeñas moléculas capaces de atravesar la pared celular vegetal. Cuando se suministran mezclas apropiadas con estas moléculas reguladoras del crecimiento, muchos tipos de células vegetales proliferan en cultivo, produciendo una masa de células no diferenciadas denominadas callo (Fig. 1.42).

Es importante tener en cuenta que muchas células vegetales son capaces de formar cualquiera de los distintos tipos celulares y tejidos necesarios para regenerar una planta completa. En consecuencia, mediante la manipulación apropiada de nutrientes y de las moléculas reguladoras del crecimiento, las células vegetales no diferenciadas en cultivo pueden ser inducidas para formar variedad de tejidos vegetales, incluyendo raíces, tallos y hojas. En muchos casos, incluso una planta entera puede regenerarse a partir de una sola célula en cultivo. Además de su interés teórico, la habilidad de producir una nueva planta desde una sola célula manipulada en cultivo

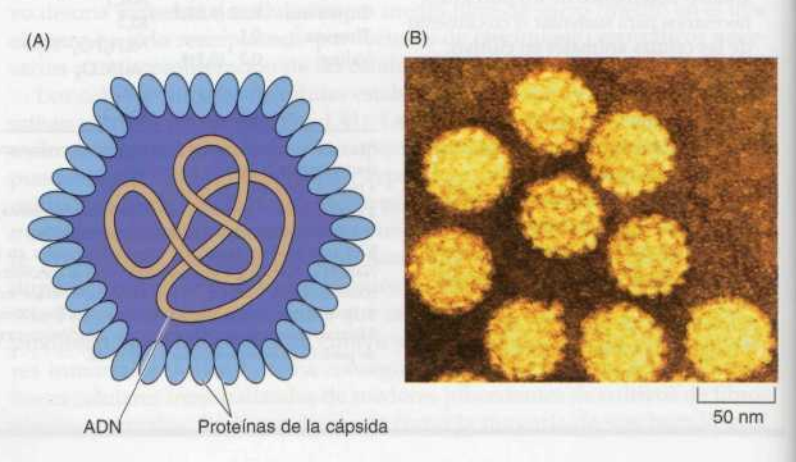


Figura 1.43 Estructura de un virus animal. (A) Partículas del papilomavirus que contienen una pequeña molécula de ADN circular encapsulada en una cubierta de proteínas (la cápsida). (B) Micrografía electrónica de partículas del virus del papiloma humano. Se han añadido colores artificiales. (B, Linda Stannard/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.)



MEDICINA MOLECULAR

Virus y cáncer

Enfermedad

El cáncer incluye un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación celular incontrolada. El crecimiento de las células animales normales está cuidadosamente regulado para mantener las necesidades del organismo al completo. Por el contrario, las células cancerígenas crecen de manera descontrolada, invadiendo e interfiriendo en la función de tejidos y órganos normales. El cáncer es la segunda causa más común de muerte (después de las enfermedades cardíacas) en Estados Unidos. Aproximadamente uno de cada tres americanos desarrollará cáncer en algún momento de su vida y, en espera de mejores avances en su tratamiento, cerca de uno de cada cuatro americanos morirá de esta enfermedad. Entender las causas del cáncer y el desarrollo de nuevos métodos de tratamiento resultan por tanto los principales objetivos de la investigación médica.

Bases moleculares y celulares

Actualmente sabemos que el cáncer es el resultado de mutaciones en los genes que normalmente controlan la proliferación celular. Los descubrimientos fundamentales que han conducido a la identificación de estos genes han surgido de los estudios de virus que causan cáncer en animales, el prototipo de los cuales fue aislado por Peyton Rous en 1911. Rous descubrió que los sarcomas (un cáncer del tejido conectivo) en pollos podían transmitirse mediante un virus, o RSV (siglas en inglés del Virus del Sarcoma de Rous). Debido a que RSV es un retrovirus con un genoma de tan solo 10.000 pares de bases, éste podía someterse a análisis moleculares mucho más fácilmente que los complejos genomas de los pollos u otras células animales. Estos estudios condujeron a la identificación de un gen específico causante del cáncer (oncogén) transportado por el virus, y al descubrimiento de genes relacionados en las células normales de todas las especies de vertebrados, incluyendo a los humanos. Algunos cánceres en los humanos se sabe que están causados por virus; otros resultan de las mutaciones en los genes de las células normales de forma similar al primer oncogén identificado en el RSV.

Prevención y tratamiento

Los cánceres humanos que están causados por virus incluyen el cervical y otros cánceres anogenitales (virus del papiloma), cáncer de hígado (virus de la hepatitis B y C), y algunos tipos de linfomas (virus Epstein-Barr y el virus humano linfotrópico de las células T). Juntos, estos cánceres inducidos por virus representan alrededor del 20% de la incidencia de cáncer en el mundo. En principio, estos cánceres se podrían prevenir con vacunas en contra del virus responsable, consiguiéndose un progreso considerable en este área el desarrollo de una vacuna efectiva contra el virus de la hepatitis B y papilomavirus humanos.

Otros cánceres humanos están causados por la mutación de genes en células normales, muchas de las cuales ocurren durante la vida del individuo en lugar de heredarse. Los estudios sobre los virus causantes de cánceres han proporcionado la identificación de muchos genes responsables de los cánceres no inducidos por virus, y el entendimiento de los mecanismos moleculares responsables del desarrollo del cáncer. Se están haciendo verdaderos esfuerzos para utilizar la biología molecular y celular del cáncer para desarrollar nuevos avances en su tratamiento. De hecho, la primera droga de diseño eficaz en el tratamiento del cáncer humano (la droga del fármaco imatinib o Gleevec, descrito en el Cap. 18) fue desarrollada contra un gen muy similar al oncogén RSV.

Referencia

Rous, P. 1911. Un sarcoma del ave de corral transmisible por un agente separable de las células tumorales. *J. Exp. Med.* 13: 397-411.



El tumor trasplantado del que fue aislado el virus del sarcoma de Rous.

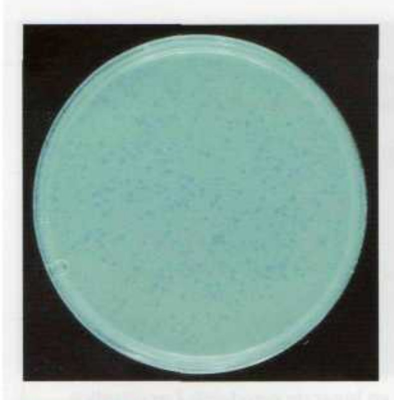


Figura 1.44 Placas de bacteriófagos. Las placas de T4 son visibles en un tapiz de *E. coli*. Cada placa se forma por la replicación de una sola partícula del virus. (E. C. S. Chen/Visuals Unlimited.)

hace posible la introducción de alteraciones genéticas en las plantas, abriendo importantes posibilidades para la ingeniería genética agrícola.

Virus

Los virus son parásitos intracelulares incapaces de replicarse por sí mismos. Se reproducen mediante la infección de células huésped y la usurpación de la maquinaria celular para producir más partículas virales. En sus formas más simples, los virus consisten solamente en ácido nucleico genómico (ADN o ARN) rodeado de una cubierta proteínica (Fig. 1.43). Los virus son importantes para la biología molecular y celular porque proporcionan sistemas simples que pueden ser utilizados para investigar las funciones de las células. Ya que la replicación de los virus depende del metabolismo de las células infectadas, los estudios sobre virus han revelado muchos de los aspectos fundamentales de la biología celular. Estudios sobre los virus bacterianos contribuyeron sustancialmente a la comprensión de los mecanismos básicos de la genética molecular, y fueron los experimentos con virus vegetales (con el virus del mosaico del tabaco) los que demostraron por primera vez el potencial genético del ARN. Los virus animales han proporcionado pruebas sensibles para las investigaciones de varias actividades de las células eucariotas.

■ **Los virus animales a menudo son utilizados en terapia génica como transportador de genes para introducirlos en las células.**

El rápido crecimiento y el pequeño tamaño de las bacterias hacen de ellas un elemento excelente para los experimentos en biología molecular, y los virus bacterianos (**bacteriófagos**) han simplificado el estudio de la genética bacteriana. Uno de los bacteriófagos más importantes es T4, que infecta y se replica en *E. coli*. La infección con una sola partícula de T4 conduce a la formación de una progenie de aproximadamente 200 partículas virales en 20-30 minutos. La célula infectada inicialmente después estalla (se lisa), liberando las partículas virales al medio, donde pueden infectar a nuevas células. En un cultivo de bacterias creciendo en un medio con agar, la replicación de T4 conduce a la formación de una zona clara de células lisadas (una placa) en una plancha o «césped» de bacterias (Fig. 1.44). Si las partículas virales infecciosas son fáciles de reproducir y de manipular, los mutantes virales —p. ej., virus que crecerán en una cepa de *E. coli* pero no en otra— son fáciles de aislar. Por tanto, T4 se manipula con mayor frecuencia que *E. coli* en estudios de genética molecular. Además, el genoma de T4 es 23 veces menor que el de *E. coli* —aproximadamente 0,2 millones de pares de bases— lo cual facilita el análisis genético. Otros bacteriófagos tienen incluso genomas

Tabla 1.3 Ejemplos de virus animales

Familia de virus	Miembro representativo	Tamaño del genoma (miles de pares de bases)
Genomas ARN		
Picornavirus	Poliovirus	7-8
Togavirus	Virus de la rubéola	12
Flavivirus	Virus de la fiebre amarilla	10
Paramixovirus	Virus del sarampión	16-20
Ortomixovirus	Virus de la gripe	14
Retrovirus	Virus de la inmunodeficiencia humana	9
Genomas ADN		
Hepadnavirus	Virus de la hepatitis B	3,2
Papovavirus	Papilomavirus humano	5-8
Adenovirus	Adenovirus	36
Herpesvirus	Virus del herpes simple	120-200
Poxvirus	Virus Vaccinia	130-280

más pequeños —el más simple consiste en moléculas de ARN de tan solo 3.600 nucleótidos—. Los virus bacterianos han proporcionado, por tanto, unos sistemas de experimentación extremadamente útiles para la genética molecular. Los estudios de estos virus son los responsables del descubrimiento de principios fundamentales de la biología molecular.

Debido al aumento de la complejidad del genoma de las células animales, los virus han sido aún más importantes en los estudios de las células animales que en los estudios de las bacterias. Muchos virus animales se replican y se estudian mediante la formación de placas en los cultivos celulares, mucho más que los bacteriófagos. Además, los genomas de los virus animales son similares en complejidad a los virus bacterianos (variando aproximadamente desde 3.000 a 300.000 pares de bases), de tal forma que los virus animales son mucho más manejables que los de sus células huésped.

Existen diversidad de virus animales, cada uno de ellos presentando ADN o ARN como material genético (Tabla 1.3). Una familia de virus animales —los **retrovirus**— contienen genomas de ARN en sus partículas virales pero sintetizan una copia de ADN de su genoma en las células infectadas. Estos virus proporcionan un buen ejemplo de la importancia de los virus como modelos, ya que los estudios de los retrovirus fueron los que demostraron la síntesis del ADN a partir de los moldes de ARN —una manera fundamental de transferencia de información genética ahora conocida en células procariotas y eucariotas—. Otros ejemplos en los que los virus animales han proporcionado modelos importantes para la investigación de sus células huésped incluyen estudios de la replicación del ADN, transcripción, procesamiento del ARN y transporte y secreción de proteínas.

Cabe destacar que la infección por algunos virus animales, en lugar de matar a la célula huésped, convierten a una célula normal en una célula cancerosa. Los estudios sobre estos virus causantes de cánceres, descritos por primera vez por Peyton Rous en 1911, no solo han proporcionado las bases de nuestro actual conocimiento del cáncer a nivel molecular y celular, sino que también han conducido al descubrimiento de muchos mecanismos moleculares que controlan el crecimiento y la diferenciación de las células animales.

RESUMEN

ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LAS CÉLULAS

La primera célula: Todas las células existentes en la actualidad, procariotas y eucariotas, descienden de un único antepasado. Se cree que la primera célula apareció al menos hace 3.800 billones de años como resultado del recubrimiento del ARN, capaz de autorreplicarse, en una membrana de fosfolípidos.

Evolución del metabolismo: Las primeras reacciones para la creación de energía metabólica fueron en forma de glicólisis anaerobia. Después evolucionó la fotosíntesis, seguida del metabolismo oxidativo.

Actuales procariotas: Los actuales procariotas se encuentran divididos en dos grupos, las arquebacterias y las eubacterias, que divergen al principio de la evolución.

Células eucariotas: Las células eucariotas, que son más grandes y complejas que las células procariotas, contienen un núcleo, orgánulos citoplasmáticos y un citoesqueleto.

PALABRAS CLAVE

célula procariota, célula eucariota, mundo del ARN, fosfolípidos, anfipáticos, hidrofóbico, hidrofílico

adenosina 5'-trifosfato (ATP), glicólisis, fotosíntesis, metabolismo oxidativo

arqueobacterias, eubacterias, cianobacterias, *Escherichia coli* (*E. coli*), pared celular, membrana plasmática, ribosoma

núcleo, mitocondria, cloroplasto, lisosoma, peroxisoma, vacuola, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, citoesqueleto, endosimbiosis

PALABRAS CLAVE	RESUMEN
endosimbiosis	*El origen de células eucariotas*: Se cree que las células eucariotas se han desarrollado a partir de asociaciones simbióticas de procariotas. El genoma de eucariotas puede haber surgido a partir de la fusión de genomas eubacterianos y arqueobacterianos.
levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, seudopodium, célula epitelial, fibroblasto, eritrocito, granulocito, monocito, macrófago, linfocito, neurona	*Desarrollo de los organismos multicelulares*: Los eucariotas más simples son organismos unicelulares, como las levaduras y las amebas. Los organismos multicelulares evolucionaron por la asociación entre los eucariotas unicelulares, y la reproducción por división condujo al desarrollo de muchas clases de células especializadas que forman las plantas y animales del presente.
	CÉLULAS COMO MODELOS EXPERIMENTALES
	E. coli: Debido a su simplicidad genética y su fácil estudio, las bacterias como *E. coli* resultan particularmente útiles para la investigación de los aspectos fundamentales de la bioquímica y biología molecular.
	Levaduras: Por ser las células eucariotas más simples, las levaduras son un modelo importante para el estudio de diversos aspectos de la biología celular eucariota.
Caenorhabditis elegans	**Caenorhabditis elegans**: El nematodo *C. elegans* es un organismo multicelular simple que sirve como modelo importante para la biología del desarrollo.
Drosophila melanogaster	**Drosophila melanogaster**: Debido al análisis genético tan extenso, los estudios de la mosca de la fruta *Drosophila* han conducido a avances superiores en el entendimiento del desarrollo animal.
Arabidopsis thaliana	**Arabidopsis thaliana**: La pequeña planta de flor *Arabidopsis* se utiliza como modelo para los estudios de la biología molecular de las plantas y su desarrollo.
***Xenopus laevis*, pez cebra**	*Vertebrados*: Muchos tipos de células de los vertebrados pueden crecer en cultivo, donde pueden ser estudiadas bajo condiciones de laboratorio controladas. Los tipos de células especializadas, como las neuronas y las células musculares, proporcionan modelos útiles para la investigación de determinados aspectos de la biología celular. La rana *Xenopus laevis* y el pez cebra son importantes modelos para el estudio del desarrollo de los primeros vertebrados, y el ratón es la especie de mamífero adecuada para el análisis genético.
	INSTRUMENTOS DE LA BIOLOGÍA CELULAR
resolución, microscopia de campo luminoso, microscopia de fase-contraste, microscopia interferencia-contraste diferencial, microscopia interferencia-contraste diferencial potenciada con vídeo, microscopia fluorescente, proteína fluorescente verde (GFP), recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueamiento (FRAP), transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) microscopia confocal, microscopia por excitación de dos fotones	*Microscopia óptica*: Se aplican diversos métodos para visualizar las células y las estructuras subcelulares y para determinar la localización intracelular de moléculas específicas usando el microscopio óptico.

RESUMEN

Microscopia electrónica: La microscopia electrónica, con una resolución aproximada cien veces mayor que la del microscopio óptico, se utiliza para analizar los detalles de la estructura celular.

Separación subcelular: Los orgánulos de las células eucariotas se pueden aislar para su análisis bioquímico mediante la centrifugación diferencial.

Crecimiento de células animales en cultivo: La propagación de las células animales en cultivo ha permitido el estudio de los mecanismos que controlan el crecimiento y la diferenciación.

Cultivo de células vegetales: Los cultivos de células vegetales se pueden diferenciar para formar tipos de células especializadas; en algunos casos, pueden regenerar plantas enteras.

Virus: Los virus proporcionan modelos simples para el estudio de la función celular.

PALABRAS CLAVE

microscopia de transmisión de electrones, tomografía electrónica, sombreado de metal, separación por congelación, aguafuerte congelado, microscopia electrónica de barrido

centrifugación diferencial, ultracentrifugación, centrifugación en gradiente-densidad, centrifugación por velocidad, centrifugación de equilibrio

célula madre embrionaria, cultivo primario, línea celular

callo

bacteriólogo, retrovirus

Preguntas

1. ¿Qué demostraron los experimentos de Stanley Miller sobre la formación de moléculas orgánicas?

2. ¿Qué tipo de macromolécula es capaz de dirigir su propia autorreplicación?

3. Discute las evidencias que apuntan que las mitocondrias y los cloroplastos se originaron a partir de bacterias que fueron internalizadas por el precursor de las células eucariotas.

4. ¿Por qué se cree que la fotosíntesis ha favorecido la evolución del metabolismo oxidativo?

5. Dado que el diámetro de una célula bacteriana de *S. aureus* es de 1 µm y el diámetro de un macrófago humano es de 50 µm, ¿cuántas células de *S. aureus* caben en el interior de un solo macrófago humano? Asume que las células son esféricas.

6. ¿Qué organismo modelo proporciona el sistema más sencillo para el estudio de la replicación del ADN eucariótico?

7. Estás estudiando un gen implicado en el desarrollo embrionario mamario. ¿Qué organismo modelo sería el más apropiado para tus estudios?

8. ¿Qué resolución se puede obtener con un microscopio óptico si la muestra se observa al aire en lugar de a través de aceite? Asume que la longitud de onda de la luz visible es 0,5 µm.

9. Estás a punto de comprar un microscopio de investigación para tu laboratorio, y puedes elegir entre dos lentes objetivas diferentes. Una posee un aumento de ×100 y una apertura numérica de 1.1. La otra posee un aumento de ×60 y una apertura numérica de 1.3. Suponiendo que el precio no es un problema, ¿cuál de estos objetivos elegirías?

10. ¿Qué ventaja posee el uso de la proteína verde fluorescente (GFP) sobre el empleo de anticuerpos marcados con sondas fluorescentes para el estudio de la localización y movimiento de una proteína en el interior celular?

11. *Identifica las diferentes características o propiedades de los orgánulos que permiten la separación por centrifugación de velocidad, en comparación con una centrifugación de equilibrio en un gradiente de sucrosa.*

12. ¿Por qué generalmente es necesario el suero en el medio empleado para el cultivo de células animales?

13. Diferenciar entre cultivos de células primarias y líneas celulares inmortalizadas.

14. ¿Por qué es importante la capacidad de cultivar células madre embrionarias?

Bibliografía

Origen y evolución de las células

Andersson, S. G. E., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. M. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A.-S. Eriksson, H. H. Winkler and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133–140. [P]

Cech, T. R. 1986. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4360–4363. [P]

Darnell, J. E. and W. F. Doolittle. 1986. Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1271–1275. [P]

DeDuve, C. 2007. The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Rev. Genet.* 8: 395–403. [R]

Dyall, S. D., M. T. Brown and P. J. Johnson. 2004. Ancient invasions: From endosymbionts to organelles. *Science* 304: 253–257. [R]

Gesteland, R. F., T. R. Cech and J. F. Atkins (eds.). 1999. *The RNA World*. 2nd ed. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Johnston, W. K., P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner and D. P. Bartel. 2001. RNA-catalyzed RNA polymerization: Accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* 292: 1319–1325. [P]

Joyce, G. F. 2007. A glimpse of biology's first enzyme. *Science* 315: 1507–1508. [R]

Kasting, J. F. and J. L. Siefert. 2002. Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* 296: 1066–1068. [R]

Margulis, L. 1992. *Symbiosis in Cell Evolution*. 2nd ed. New York: W. H. Freeman.

Martin, W. and T. M. Embley. 2004. Early evolution comes full circle. *Nature* 431: 134–137. [R]

Miller, S. L. 1953. A production of amino acids under possible primitive Earth conditions. *Science* 117: 528–529. [P]

Rivera, M. C. and J. A. Lake. 2004. The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes. *Nature* 431: 152–155. [P]

Szostak, J. W., D. P. Bartel and P. L. Luisi. 2001. Synthesizing life. *Nature* 409: 387–390. [R]

Células como modelos experimentales

Adams, M. D. and 194 others. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185–2195. [P]

Blattner, F. R., G. Plunkett III., C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1462. [P]

Botstein, D., S. A. Chervitz and J. M. Cherry. 1997. Yeast as a model organism. *Science* 277: 1259–1260. [R]

Goffeau, A. and 15 others. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546–567. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–945. [P]

Lieschke, G. J. and P. D. Currie. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Rev. Genet.* 8: 353–367. [R]

Meyerowitz, E. M. 2002. Plants compared to animals: The broadest comparative study of development. *Science* 295: 1482–1485. [R]

Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002. Initial sequence and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520–562. [P]

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815. [P]

The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2018. [P]

Instrumentos de la biología celular

Bowers, W. E. 1998. Christian de Duve and the discovery of lysosomes and peroxisomes. *Trends Cell Biol.* 8: 330–333 [R]

Cairns, J., G. S. Stent and J. D. Watson (eds.). 2007. *Phage and the Origins of Molecular Biology, The Centennial Edition*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Chudakov, D. M., S. Lukyanov and K. A. Lukyanov. 2005. Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. *Trends Biotechnol.* 23: 605–613. [R]

Claude, A. 1975. The coming of age of the cell. *Science* 189: 433–435. [R]

De Duve, C. 1975. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189: 186–194. [R]

Eagle, H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 235: 442–447. [P]

Flint, S. J., L. W. Enquist, V. R. Racaniello and A. M. Skalka. 2003. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press.

Giepmans, B. N. G., S. R. Adams, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien. 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312: 217–224. [R]

Kam, Z., E. Zamir and B. Geiger. 2001. Probing molecular processes in live cells by quantitative multidimensional mcroscopy. *Trends Cell Biol.* 11: 329–334. [R]

Koster, A. J. and J. Klumperman. 2003. Electron microscopy in cell biology: Integrating structure and function. *Nature Rev. Molec. Cell Biol.* 4: SS6–SS10. [R]

Lippincott-Schwartz, J., N. Altan-Bonnet and G. H. Patterson. 2003. Photobleaching and photoactivation: Following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biol.* 5: S7–S14. [R]

McIntosh, R., D. Nicastro and D. Mastronarde. 2005. New views of cells in 3D: An introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol.* 15: 43–51. [R]

Miyawaki, A., A. Sawano and T. Kogure. 2003. Lighting up cells: Labelling proteins with fluorophores. *Nature Cell Biol.* 5: S1–S7. [R]

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347–358. [R]

Piston, D. W. 1999. Imaging living cells and tissues by two-photon excitation microscopy. *Trends Cell Biol.* 9: 66–69 [R]

Porter, K. R., A. Claude and E. F. Fullam. 1945. A study of tissue culture cells by electron microscopy. *J. Exp. Med.* 81: 233–246. [P]

Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13: 397–411. [P]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5: 154–158. [R]

Spector, D. L., R. Goldman and L. Leinwand. 1998. *Cells: A Laboratory Manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

CAPÍTULO 2

Composición de las células

LAS CÉLULAS SON ESTRUCTURAS INCREÍBLEMENTE COMPLEJAS Y VARIADAS, capaces no sólo de autorreplicarse —la propia esencia de la vida— sino también de realizar una amplia gama de tareas especializadas en organismos pluricelulares. Sin embargo, las células siguen las mismas leyes de la química y la física que determinan el comportamiento de los sistemas inertes. En consecuencia, la biología molecular moderna trata de entender los procesos moleculares en términos de reacciones físicas y químicas.

Este capítulo considera la composición química de las células y las propiedades de las moléculas responsables en último término de todas las actividades celulares. Se confiere a las proteínas especial énfasis debido a sus papeles diversos en la célula, incluyendo actuar como enzimas que catalizan casi todas las reacciones biológicas y como componentes clave de las membranas celulares. En los últimos años, han sido desarrolladas una variedad de nuevas técnicas que permiten el análisis de proteínas a gran escala. Se espera que este campo emergente de la proteómica tenga un gran impacto sobre nuestra comprensión de la expresión e interacción de proteínas en el interior celular, de forma parecida al impacto que la secuenciación a gran escala del genoma ha tenido sobre nuestra comprensión del contenido genético de las células y organismos.

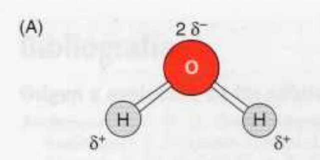
Moléculas de las células

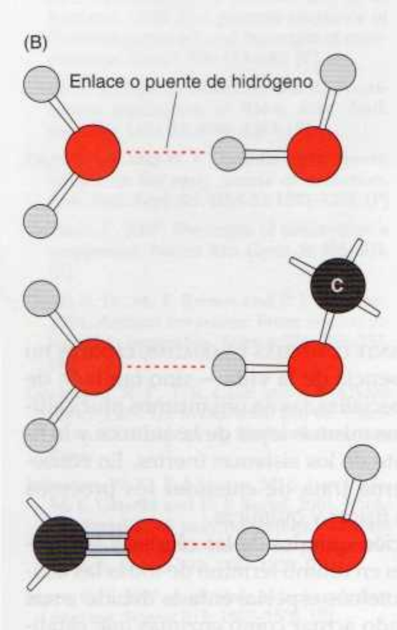
Las células están compuestas de agua, iones inorgánicos y moléculas que contienen carbono (orgánicas). El agua es la molécula más abundante en las células, representando el 70% o más de la masa celular total. En consecuencia, las interacciones entre el agua y el resto de los componentes celulares tienen una importancia central en la química biológica. La propiedad crítica del agua al respecto es que es una molécula polar, donde los átomos de hidrógeno poseen una carga ligeramente positiva y el oxígeno posee una carga ligeramente negativa (Fig. 2.1). Debido a su naturaleza polar, las moléculas de agua pueden formar enlaces o puentes de hidrógeno entre sí o con otras moléculas polares, así como interaccionar con iones cargados positiva o negativamente. Como resultado de estas interacciones, los iones y las moléculas polares son fácilmente solubles en agua (hidrófilas). Por el contrario, las moléculas no polares, que no pueden interaccionar con el agua, son escasamente solubles en un medio acuoso (hidrófobas). En consecuencia, las moléculas no polares tienden a minimizar su contacto con el agua relacio-

21 **Animación web**

Formación de enlaces

La polimerización de azúcares, aminoácidos y nucleótidos para formar polisacáridos, polipéptidos y ácidos nucleicos, respectivamente, ocurre a través de la formación de enlaces covalentes.





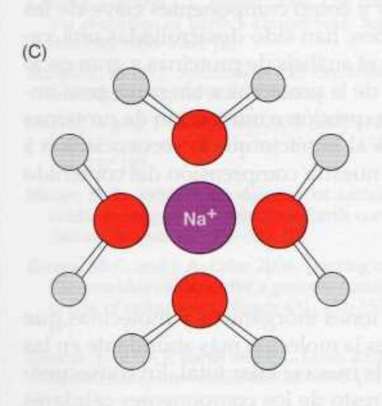


Figura 2.1 Características del agua. (A) El agua es una molécula polar, con una carga ligeramente negativa (δ^-) en el átomo de oxígeno y una carga ligeramente positiva (δ^+) en los átomos de hidrógeno. Debido a esta polaridad, las moléculas de agua pueden formar enlaces o puentes de hidrógeno (líneas discontinuas) bien entre sí o con otras moléculas polares (B), además de interaccionar con iones cargados (C).

nándose estrechamente entre sí. Como se trata más adelante en este capítulo, las interacciones de moléculas polares y no polares con el agua y entre sí desempeñan papeles cruciales en la formación de estructuras biológicas, como las membranas celulares. Los iones inorgánicos de la célula, incluyendo el sodio (Na^+), potasio (K^+), magnesio (Mg^{2+}), calcio (Ca^{2+}), fosfato (HPO_4^{2-}), cloro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-), constituyen un 1% o menos de la masa celular total. Estos iones están implicados en numerosos aspectos del metabolismo celular, y de este modo, desempeñan importantes papeles en la función celular.

Sin embargo, las moléculas orgánicas son los únicos componentes característicos de las células. La mayoría de estos componentes orgánicos pertenecen a una de cuatro clases de moléculas: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las proteínas, los ácidos nucleicos y la mayoría de los carbohidratos (polisacáridos) son macromoléculas formadas por la unión (polimerización) de cientos o miles de precursores de bajo peso molecular: aminoácidos, nucleótidos o azúcares simples, respectivamente. Dichas macromoléculas constituyen entre el 80% y 90% del peso en seco de la mayoría de las células. Los lípidos son el otro constituyente principal de las células. El resto de la masa celular se compone de una variedad de pequeñas moléculas, incluyendo los precursores macromoleculares. La química básica de las células puede así entenderse en términos de las estructuras y funciones de cuatro tipos principales de macromoléculas orgánicas.

Carbohidratos

Los **carbohidratos** incluyen a los azúcares simples y a los polisacáridos. Estos azúcares simples, como la glucosa, son los nutrientes principales de las células. Como se trata en el Capítulo 3, su degradación proporciona no solo la fuente de energía celular sino el material inicial para la síntesis de otros componentes celulares. Los polisacáridos son formas de reserva de los azúcares y constituyen componentes estructurales de la célula. Además, los polisacáridos y polímeros más cortos de azúcares actúan como marcadores para una variedad de procesos de reconocimiento celular, incluyendo la adhesión entre células y el transporte de proteínas a los destinos intercelulares apropiados.

La estructura de los azúcares simples (**monosacáridos**) más representativa aparece en la Figura 2.2. La fórmula básica de estas moléculas es $(CH_2O)_n$, a partir de la cual procede el nombre de carbohidrato (C = «carbo» y H_2O = «hidrato»). El azúcar de seis átomos de carbono ($n = 6$), la glucosa, $(C_6H_{12}O_6)$ es especialmente importante en las células, ya que proporciona la principal fuente de energía celular. Otros azúcares simples tienen entre tres y siete átomos de carbono, siendo los azúcares de tres y cinco carbonos los más comunes. Los azúcares que contienen cinco o más átomos de carbono pueden ciclarse para formar estructuras anulares, que constituyen las formas predominantes de estas moléculas dentro de las células. Como se refleja en la Figura 2.2, los azúcares ciclados existen en dos formas alternativas (llamadas α o β), dependiendo de la configuración del carbono 1.

Los monosacáridos pueden unirse entre sí mediante reacciones de deshidratación, donde se extrae H_2O y se unen los azúcares mediante un **enlace glicosídico** o **glucosídico** entre dos de sus átomos de carbono (Fig. 2.3). Si

El edulcorante artificial sucralosa (Splenda) es un derivado sintético del azúcar común en el que algunos de los grupos hidroxilo del azúcar han sido sustituidos por cloro.

Triosas ($C_3H_6O_3$)

Gliceraldehído

Dihidroxiacetona

Pentosas ($C_5H_{10}O_5$)

Ribosa — Forma lineal — Formas anulares — α — β

Hexosas ($C_6H_{12}O_6$)

Glucosa — Forma lineal — Formas anulares — α — β

Figura 2.2 Estructura de los azúcares simples. Se ilustran los azúcares simples más representativos con tres, cinco y seis átomos de carbono (triosas, pentosas y hexosas respectivamente). Los azúcares con cinco o más átomos de carbono pueden ciclarse para formar anillos, que existen en dos formas alternativas (llamadas α o β), dependiendo de la configuración del carbono 1.

Si se unen unos pocos azúcares, el polímero resultante se denomina **oligosacárido**. Si se implican un número elevado (cientos o miles) de azúcares, los polímeros resultantes son macromoléculas denominadas **polisacáridos**.

Los dos polisacáridos comunes —**glucógeno** y **almidón**— son las formas de depósito de carbohidratos en las células de animales y plantas respectivamente. Tanto el glucógeno como el almidón están compuestos completamente de moléculas de glucosa en la configuración α (Fig. 2.4). El enlace principal se establece entre el carbono 1 de una glucosa y el carbono 4 de una segunda glucosa. Además, tanto el glucógeno como una forma de almidón (amilopectina) contienen enlaces ocasionales α(1→6), en los que el carbono 1 de una glucosa se une al carbono 6 de una segunda glucosa. Como se ve en la Figura 2.4, estos enlaces conllevan a la formación de ramificaciones que resultan de la unión de dos cadenas independientes de enlaces α(1→4). Estas ramificaciones están presentes en el glucógeno y la amilopectina, aunque otra forma de almidón (amilosa) es una molécula sin ramificaciones.

De este modo, las estructuras del glucógeno y del almidón son similares básicamente, como lo es su función: almacenar glucosa. La **celulosa**, en contraste, tiene una función bien definida como principal componente estructural de la pared de las células de las plantas. Quizá sorprendentemente, por tanto, la celulosa también se compone enteramente de moléculas de glucosa. Los residuos de glucosa de

H_2O

Enlace glucosídico α(1→4)

Figura 2.3 Formación de un enlace glucosídico. Dos azúcares simples se unen mediante una reacción de deshidratación (una reacción en la que se extrae agua). En el ejemplo ilustrado, dos moléculas de glucosa en la configuración α se unen mediante un enlace entre los carbonos 1 y 4, que por ello recibe el nombre de enlace glucosídico α(1→4).

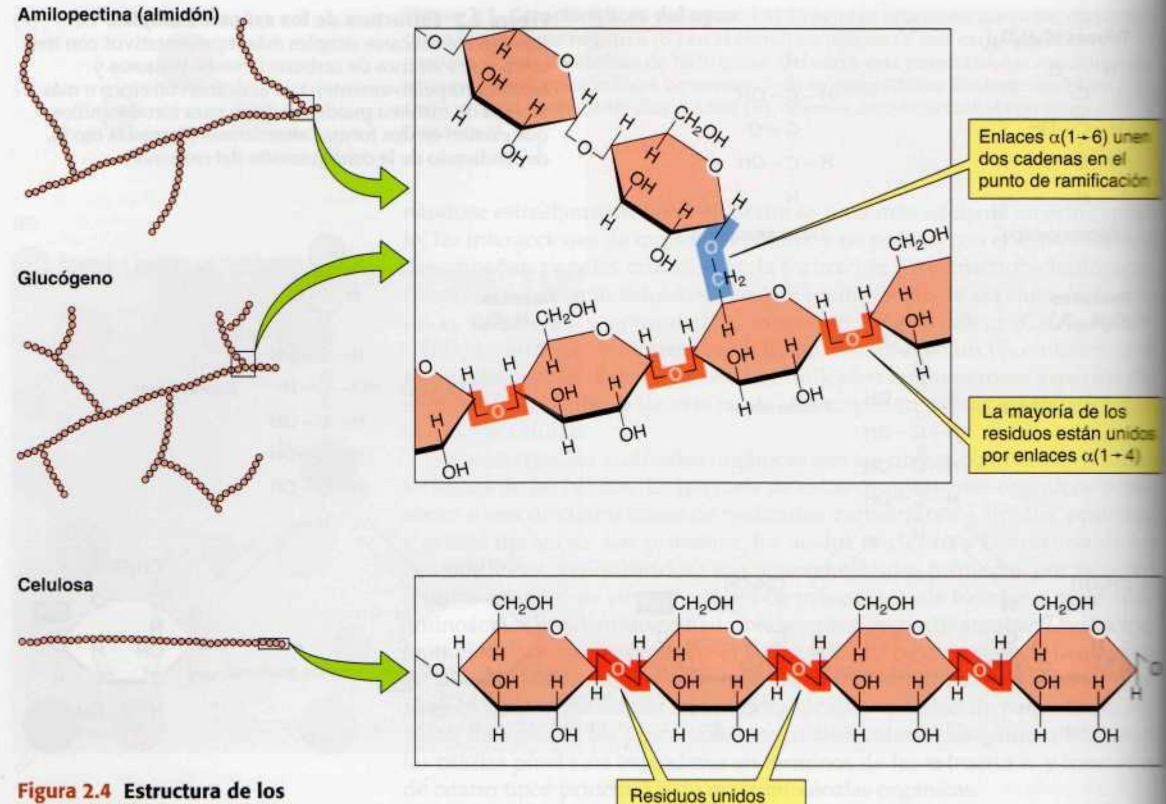


Figura 2.4 Estructura de los polisacáridos. Los polisacáridos son macromoléculas constituidas por cientos o miles de azúcares simples. El glucógeno, el almidón y la celulosa están todos compuestos únicamente por residuos de glucosa, que están unidos por enlaces glucosídicos α(1→4) en el glucógeno y el almidón, pero por enlaces β(1→4) en la celulosa. El glucógeno y una forma de almidón (amilopectina) también presentan ocasionalmente enlaces α(1→6), que sirven como puntos de ramificación al unir dos cadenas independientes α(1→4).

la celulosa, sin embargo, presentan una configuración β en vez de α, y la celulosa es un polisacárido no ramificado (véase Fig. 2.4). La unión de los residuos de glucosa por medio de enlaces β(1→4) en lugar de α(1→4) hace que la celulosa forme largas cadenas lineales que se empaquetan una junto a otra para formar fibras con gran fuerza mecánica.

Además de sus papeles en el almacenamiento de energía y en la estructura celular, los oligosacáridos y los polisacáridos son importantes en una variedad de procesos de señalización celular. Por ejemplo, los oligosacáridos se encuentran frecuentemente ligados a proteínas, donde funcionan como marcadores para dirigir las proteínas a la superficie celular o para incorporarlas a distintas organelas subcelulares. Los oligosacáridos y los polisacáridos también funcionan como marcadores en la superficie celular, desempeñando importantes papeles en el reconocimiento celular y en las interacciones entre células en los tejidos de los organismos pluricelulares.

Lípidos

Los **lípidos** desempeñan tres funciones básicas en las células. Primero, proporcionan una importante fuente de energía. Después, y de gran importancia en la biología celular, los lípidos son el componente principal de las membranas celulares. Y por último, los lípidos desempeñan importantes papeles en la señalización celular, bien como hormonas esteroideas (p. ej., estrógeno y testosterona), o como mensajeros moleculares que trasladan señales desde los receptores de la superficie celular hasta dianas dentro de la célula.

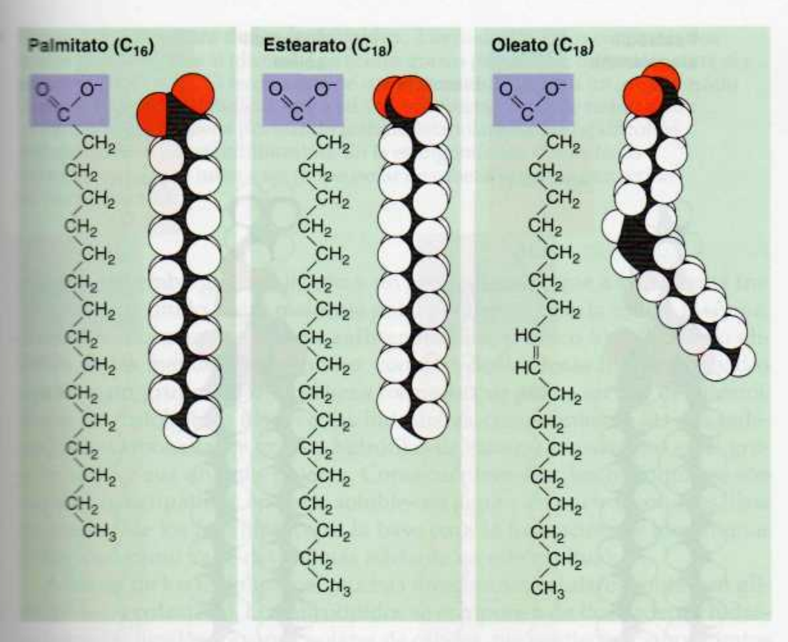


Figura 2.5 Estructura de los ácidos grasos. Los ácidos grasos consisten en largas cadenas hidrocarbonadas que terminan en un grupo carboxilo (COO^-). El palmitato y el estearato son ácidos grasos saturados que constan de 16 y 18 átomos de carbono respectivamente. El oleato es un ácido graso insaturado de 18 carbonos que contiene un doble enlace entre los carbonos 9 y 10. Observen que el doble enlace produce un acodamiento en la cadena hidrocarbonada.

Los lípidos más simples son los **ácidos grasos**, consistentes en largas cadenas hidrocarbonadas, que con mayor frecuencia contienen 16 o 18 átomos de carbono, con un grupo carboxilo (COO^-) en un extremo (Fig. 2.5). Los ácidos grasos no saturados contienen uno o más dobles enlaces entre átomos de carbono; en los ácidos grasos saturados todos los átomos de carbono están enlazados al máximo número de átomos de hidrógeno posible. Las cadenas hidrocarbonadas largas de ácidos grasos contienen sólo enlaces C—H no polares, que son incapaces de interaccionar con el agua. La naturaleza hidrófoba de estas cadenas de ácidos grasos es responsable de buena parte del comportamiento de los lípidos complejos, particularmente en la formación de las membranas biológicas.

Los ácidos grasos se almacenan en forma de **triglicéridos**, o **grasas**, que consisten en tres ácidos grasos ligados a una molécula de glicerol (Fig. 2.6). Los triglicéridos son insolubles en agua y, por tanto, se acumulan como gotas de grasa en el citoplasma. Cuando es necesario, pueden ser degradados para su utilización como moléculas procuradoras de energía (véase Cap. 3). Es de destacar que los ácidos grasos son una forma de almacenamiento de energía más eficaz que los carbohidratos, produciendo más del doble de energía por peso de material degradado. Las grasas, por tanto, permiten que se almacene energía en menos de la mitad del peso corporal que se requeriría para almacenar la misma cantidad de energía en carbohidratos — una consideración particularmente importante para los animales debido a su movilidad.

Los **fosfolípidos**, los principales componentes de las membranas celulares, se componen de dos ácidos grasos unidos a un grupo polar de cabeza (Fig. 2.7). En los fosfoglicéridos, los dos ácidos grasos están ligados a átomos de carbono del glicerol, como en los triglicéridos. El tercer carbono del

Glicerol

H_2C — CH — CH_2
O O O
C=O C=O C=O
CH_2 CH_2 CH_2

Ácidos grasos

CH_3 CH_3 CH_3



Figura 2.6 Estructura de los triglicéridos. Los triglicéridos (grasas) contienen tres ácidos grasos unidos a glicerol. En este ejemplo, los tres ácidos grasos son palmitato, pero los triglicéridos con frecuencia contienen una mezcla de distintos ácidos grasos.

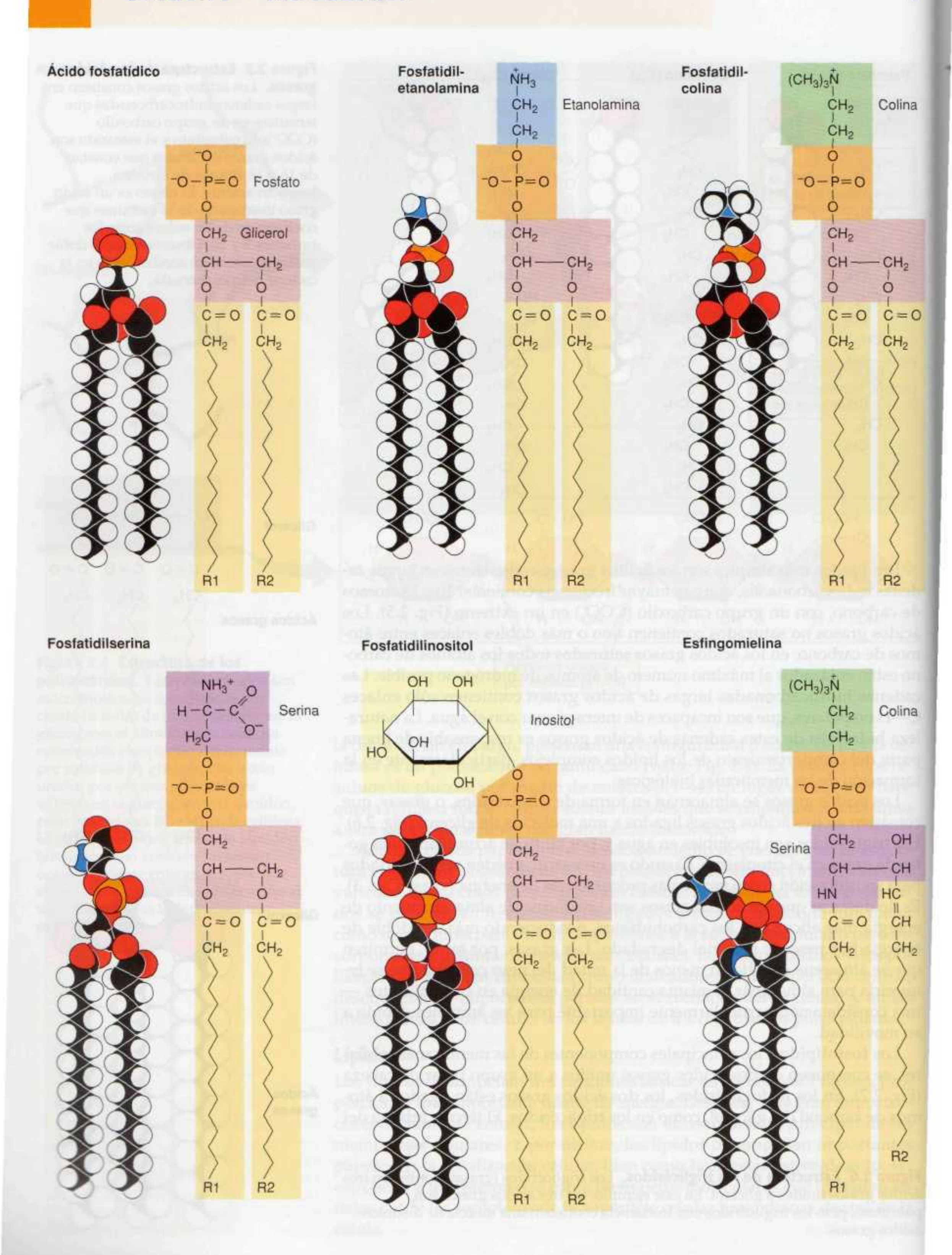

Ácido fosfatídico
Fosfato
Glicerol
R1
R2
Fosfatidil-etanolamina
Etanolamina
Fosfatidil-colina
Colina
Fosfatidilserina
Serina
Fosfatidilinositol
Inositol
Esfingomielina
Colina
Serina

Figura 2.7 Estructura de los fosfolípidos. Los fosfoglicéridos contienen dos ácidos grasos unidos al glicerol. Los ácidos grasos pueden ser diferentes entre sí y se designan R1 y R2. El tercer carbono del glicerol está ligado a un grupo fosfato (formando ácido fosfatídico), que a su vez está frecuentemente unido a otra molécula polar pequeña (formando fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, o fosfatidilinositol). En la esfingomielina dos cadenas hidrocarbonadas se unen a un grupo polar de cabeza formado por serina en vez de glicerol.

glicerol, sin embargo, está ligado a un grupo fosfato, que a su vez está frecuentemente unido a otra molécula polar pequeña, como la colina, la serina, el inositol o la etanolamina. La **esfingomielina**, el único fosfolípido no glicérico de las membranas celulares, contiene dos cadenas hidrocarbonadas unidas a un grupo polar de cabeza formado por serina en vez de glicerol. Todos los fosfolípidos tienen colas hidrófobas, consistentes en las dos cadenas hidrocarbonadas, y grupos hidrófilos de cabeza, consistentes en el grupo fosfato y sus uniones polares. Consecuentemente, los fosfolípidos son moléculas **anfipáticas**, en parte solubles en agua y en parte insolubles. Esta propiedad de los fosfolípidos es la base para la formación de membranas biológicas, como ya se detalla más adelante en este capítulo.

Además de los fosfolípidos, muchas membranas celulares contienen **glicolípidos** y **colesterol**. Los glicolípidos se componen de dos cadenas hidrocarbonadas ligadas a grupos polares de cabeza que contienen carbohidratos (Fig. 2.8). Son de esta forma similares a los fosfolípidos en su organización general como moléculas anfipáticas. El colesterol, por el contrario, consta de cuatro anillos hidrocarbonados en vez de cadenas lineales hidrocarbonadas (Fig. 2.9). Los anillos hidrocarbonados son intensamente hidrófobos, pero el grupo hidroxilo (OH) unido a un extremo del colesterol es débilmente hidrófilo, así que el colesterol también es anfipático.

Además de su papel como componentes de membranas celulares, los lípidos funcionan como moléculas de señalización, tanto dentro como fuera de las células. Las **hormonas esteroideas** (como los estrógenos y la testosterona) son derivados del colesterol (véase Fig. 2.9). Las hormonas son un

Glucosa (carbohidrato)

Serina

Figura 2.8 Estructura de los glicolípidos. Dos cadenas hidrocarbonadas unidas a un grupo polar de cabeza formado por serina y que contienen carbohidratos (p. ej., glucosa).

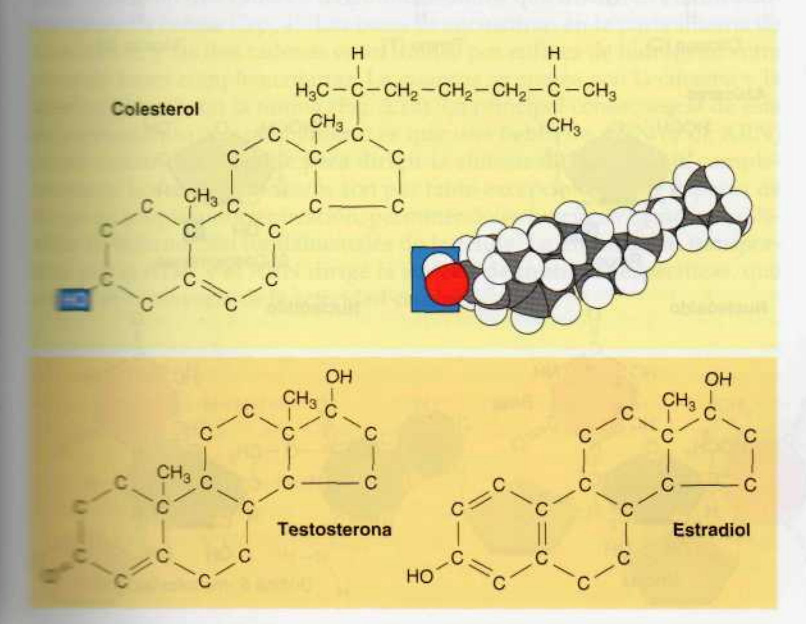


Figura 2.9 Colesterol y hormonas esteroideas. El colesterol, un importante componente de las membranas celulares, es una molécula anfipática debido a su grupo polar hidroxilo. El colesterol también es un precursor de las hormonas esteroideas, como la testosterona y el estradiol (un tipo de estrógeno). Los átomos de carbono ligados a los anillos de carbono no están representados en esta figura.

grupo variado de mensajeros químicos; todos ellos contienen cuatro anillos hidrocarbonados a los que se unen grupos funcionales específicos. Los derivados de los fosfolípidos también funcionan como mensajeros celulares dentro de las células, actuando para transmitir señales desde los receptores de la superficie celular hasta sus dianas intracelulares, que regulan una amplia gama de procesos celulares, incluyendo la proliferación celular, el movimiento, la supervivencia y la diferenciación (véase Cap. 15).

Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos —ADN y ARN— son las principales moléculas de información de la célula. El **ácido desoxirribonucleico (ADN)** desempeña un papel único como material genético, que en las células eucariotas se encuentra en el núcleo. Distintos tipos de **ácido ribonucleico (ARN)** participan en distintas actividades celulares. El **ARNmensajero (ARNm)** transporta información desde el ADN a los ribosomas, donde sirve como molde para la síntesis de proteínas. Otros dos tipos de ARN **(ARN ribosómico** y **ARN de**

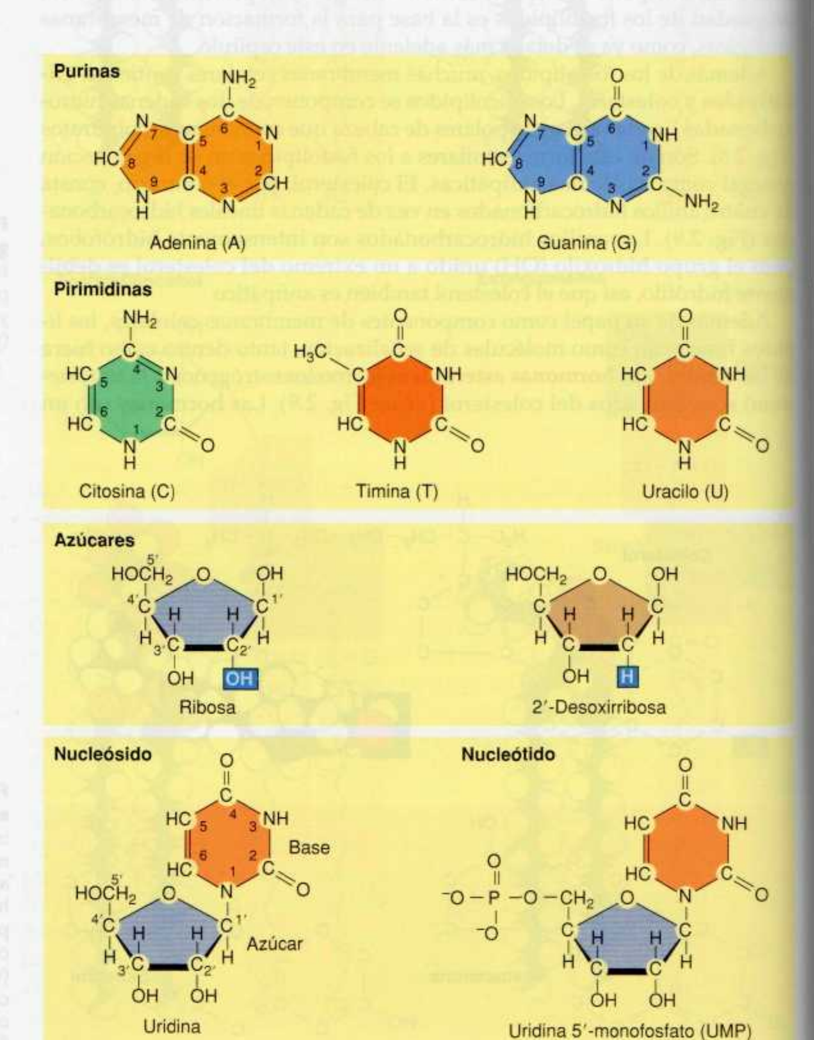
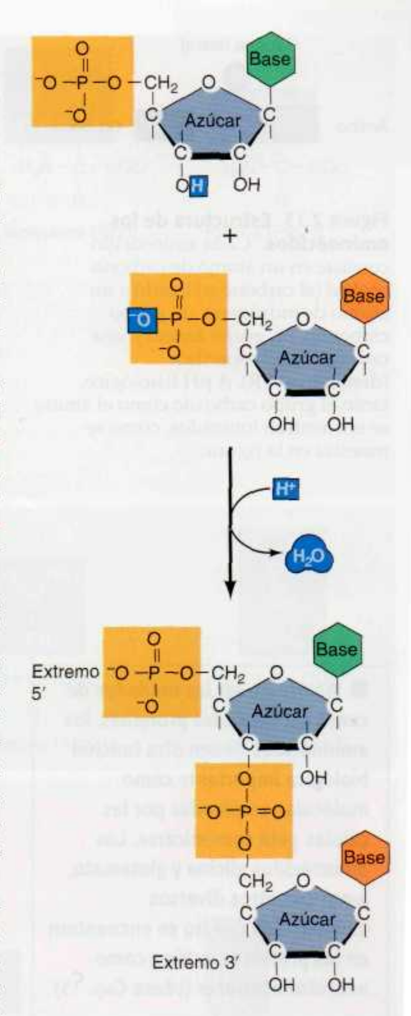


Figura 2.10 Componentes de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos contienen bases purínicas y pirimidínicas ligadas a azúcares fosforilados. Una base de un ácido nucleico ligada sólo a un azúcar es un nucleósido. Los nucleótidos además contienen uno o más grupos fosfato.

Figura 2.11 Polimerización de los nucleótidos. Un enlace fosfodiéster se forma entre el grupo 3′ hidroxilo de un nucleótido y el grupo 5′ fosfato de otro. Una cadena polinucleótida tiene un sentido —de modo que el extremo 5′ finaliza con un grupo 5′ *fosfato y el extremo 3′ termina con un grupo 3′ hidroxilo.*



transferencia) están implicados en la síntesis de proteínas. Además, otras formas de ARN están implicadas en la regulación de la expresión génica y en el procesamiento y transporte tanto del ARN como de proteínas. Además de actuar como una molécula informativa, el ARN también es capaz de catalizar diversas reacciones químicas. En las células actuales, estas incluyen reacciones implicadas tanto en la síntesis proteica como en el procesamiento del ARN.

El ADN y el ARN son polímeros de **nucleótidos**, que consisten en bases de **purina** y **pirimidina** ligadas a azúcares fosforilados (Fig. 2.10). El ADN contiene dos purinas (**adenina** y **guanina**) y dos pirimidinas (**citosina** y **timina**). Adenina, guanina y citosina también están presentes en el ARN, pero el ARN contiene **uracilo** en lugar de timina. Las bases están ligadas a azúcares (**2′-desoxirribosa** en el ADN, o **ribosa** en el ARN) para formar **nucleósidos**. Los nucleótidos además contienen uno o más grupos fosfato ligados al carbono 5′ de los azúcares de los nucleósidos.

La polimerización de nucleótidos para formar ácidos nucleicos implica la formación de **enlaces fosfodiéster** entre el 5′ fosfato de un nucleótido y el 3′ hidroxilo de otro (Fig. 2.11). Los **oligonucleótidos** son pequeños polímeros que contienen sólo unos pocos nucleótidos; los **polinucleótidos** mayores que componen el ARN y ADN celular pueden contener miles o millones de nucleótidos respectivamente. Es importante señalar que una cadena polinucleotídica tiene un sentido, con un extremo de la cadena terminando en un grupo 5′ fosfato y el otro en un grupo 3′ hidroxilo. Los polinucleótidos siempre se sintetizan en la dirección 5′ a 3′, añadiéndose un nucleótido libre al grupo 3′ OH de la cadena en formación. Por convención, la secuencia de bases en el ADN o ARN también se escribe en la dirección 5′ a 3′.

La información del ADN y del ARN se transmite por el orden de las bases en la cadena polinucleotídica. El ADN es una molécula de doble hebra que consiste en dos cadenas de polinucleótidos que discurren en direcciones opuestas (véase Cap. 4). Las bases se encuentran en la parte interna de la molécula, y las dos cadenas están unidas por enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias. La guanina se aparea con la citosina y la adenina lo hace con la timina (Fig. 2.12). La principal consecuencia de este emparejamiento complementario es que una hebra de ADN (o de ARN) puede actuar como molde para dirigir la síntesis de una cadena complementaria. Los ácidos nucleicos son por tanto excepcionalmente capaces de dirigir su propia autorreplicación, permitiéndoles funcionar como las moléculas de información fundamentales de la célula. La información transportada por el ADN y el ARN dirige la síntesis de proteínas específicas, que controlan la mayoría de la actividad celular.

Figura 2.12 Emparejamiento complementario entre bases del ácido nucleico. La formación de enlaces de hidrógeno entre bases en hebras opuestas de ADN conduce al apareamiento específico de guanina (G) con citosina (C) y de adenina (A) con la timina (T).

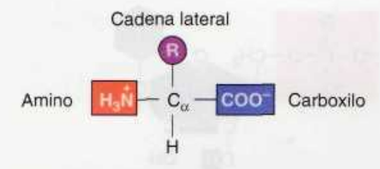


Figura 2.13 Estructura de los aminoácidos. Cada aminoácido consiste en un átomo de carbono central (el carbono α) ligado a un átomo de hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y una cadena lateral específica (denominada R). A pH fisiológico, tanto el grupo carboxilo como el amino se encuentran ionizados, como se muestra en la figura.

■ Aparte de ser las unidades de construcción de las proteínas, los aminoácidos tienen otra función biológica importante como moléculas empleadas por las células para comunicarse. Los aminoácidos glicina y glutamato, junto con otros diversos aminoácidos que no se encuentran en las proteínas, actúan como neurotransmisores (véase Cap. 15).

■ Las proteínas muestran una diversidad increíble. Algunas proteínas poco frecuentes incluyen:

Proteínas de cemento que son empleadas por los percebes para adherirse a las superficies sumergidas bajo el agua. Los científicos están intentando desarrollar estas proteínas para su uso industrial como pegamentos o recubrimientos anticorrosivos.

La seda de la araña de la Orbe Dorada es extremadamente ligera y flexible pero casi tan fuerte como Kevlar, que se emplea para fabricar los chalecos antibalas.

Los nucleótidos no sólo son importantes como los ladrillos de construcción de los ácidos nucleicos; también desempeñan papeles vitales en otros procesos celulares. Quizá el ejemplo más destacado es el adenosín 5' trifosfato (ATP), que es la principal forma de energía química dentro de las células. Otros nucleótidos funcionan de manera similar como transportadores de energía o de grupos químicos reactivos en una gran variedad de reacciones metabólicas. Además, algunos nucleótidos (p. ej., AMP cíclico) son importantes moléculas de señalización dentro de las células (véase Cap. 15).

Proteínas

Mientras que los ácidos nucleicos transportan la información genética de la célula, la responsabilidad básica de las **proteínas** es ejecutar las tareas dirigidas por esa información. Las proteínas son las más variadas de todas las macromoléculas, y cada célula contiene varios miles de proteínas diferentes, que realizan una amplia gama de funciones. Los papeles de las proteínas incluyen servir como componentes estructurales de células y tejidos, actuar en el transporte y almacenamiento de pequeñas moléculas (p. ej., en el transporte de oxígeno por la hemoglobina), transmitir información entre células (p. ej., hormonas proteicas), y proporcionar una defensa frente a la infección (p. ej., anticuerpos). La propiedad fundamental de las proteínas, sin embargo, es su capacidad para actuar como enzimas, que, como se trata en la siguiente sección, catalizan casi todas las reacciones químicas en los sistemas biológicos. De este modo, las proteínas dirigen virtualmente todas las actividades de la célula. La importancia central de las proteínas en la química biológica viene determinada por su nombre, derivado de la palabra griega *proteios*, que significa «de primer rango».

Las proteínas son polímeros de 20 **aminoácidos** distintos. Cada aminoácido consiste en un átomo de carbono (llamado carbono α) ligado a un grupo carboxilo (COO–), un grupo amino (NH_3^+), un átomo de hidrógeno, y una cadena lateral característica (Fig. 2.13). Las propiedades químicas específicas de las diferentes cadenas laterales de los aminoácidos determinan los papeles de cada aminoácido en la estructura y función proteica.

Los aminoácidos pueden agruparse en cuatro amplias categorías dependiendo de las propiedades de sus cadenas laterales (Fig. 2.14). Diez aminoácidos tienen cadenas laterales no polares que no interaccionan con el agua. La glicina es el aminoácido más simple, con una cadena lateral consistente en un sólo átomo de hidrógeno. La alanina, valina, leucina e isoleucina tienen cadenas laterales hidrocarbonadas compuestas por hasta cuatro átomos de carbono. Las cadenas laterales de estos aminoácidos son hidrófobas y de ahí que tiendan a localizarse en el interior de las proteínas, donde no se encuentran en contacto con el agua. Igualmente, la prolina tiene una cadena lateral hidrocarbonada, pero es la única que en su cadena lateral está ligada al nitrógeno del grupo amino así como al carbono α, formando una estructura cíclica. Las cadenas laterales de dos aminoácidos, cisteína y metionina, contienen átomos de azufre. La metionina es bastante hidrófoba, pero la cisteína lo es menos debido a su grupo sulfhidrilo (SH). Como se trata más adelante, el grupo sulfhidrilo de la cisteína desempeña un importante papel en la estructura proteica porque se pueden formar enlaces disulfuro entre las cadenas laterales de distintos residuos de cisteína. Finalmente, dos aminoácidos no polares, fenilalanina y triptófano, tienen cadenas laterales que contienen anillos aromáticos muy hidrófobos.

Cinco aminoácidos tienen cadenas laterales sin carga pero polares. Estos incluyen la serina, la treonina y la tirosina, que tienen grupos hidroxilo en sus cadenas laterales, así como la asparragina y la glutamina, que tiene grupos amida ($O{=}C{-}NH_2$) polares. Debido a que las cadenas laterales de estos aminoácidos pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua, estos amino-

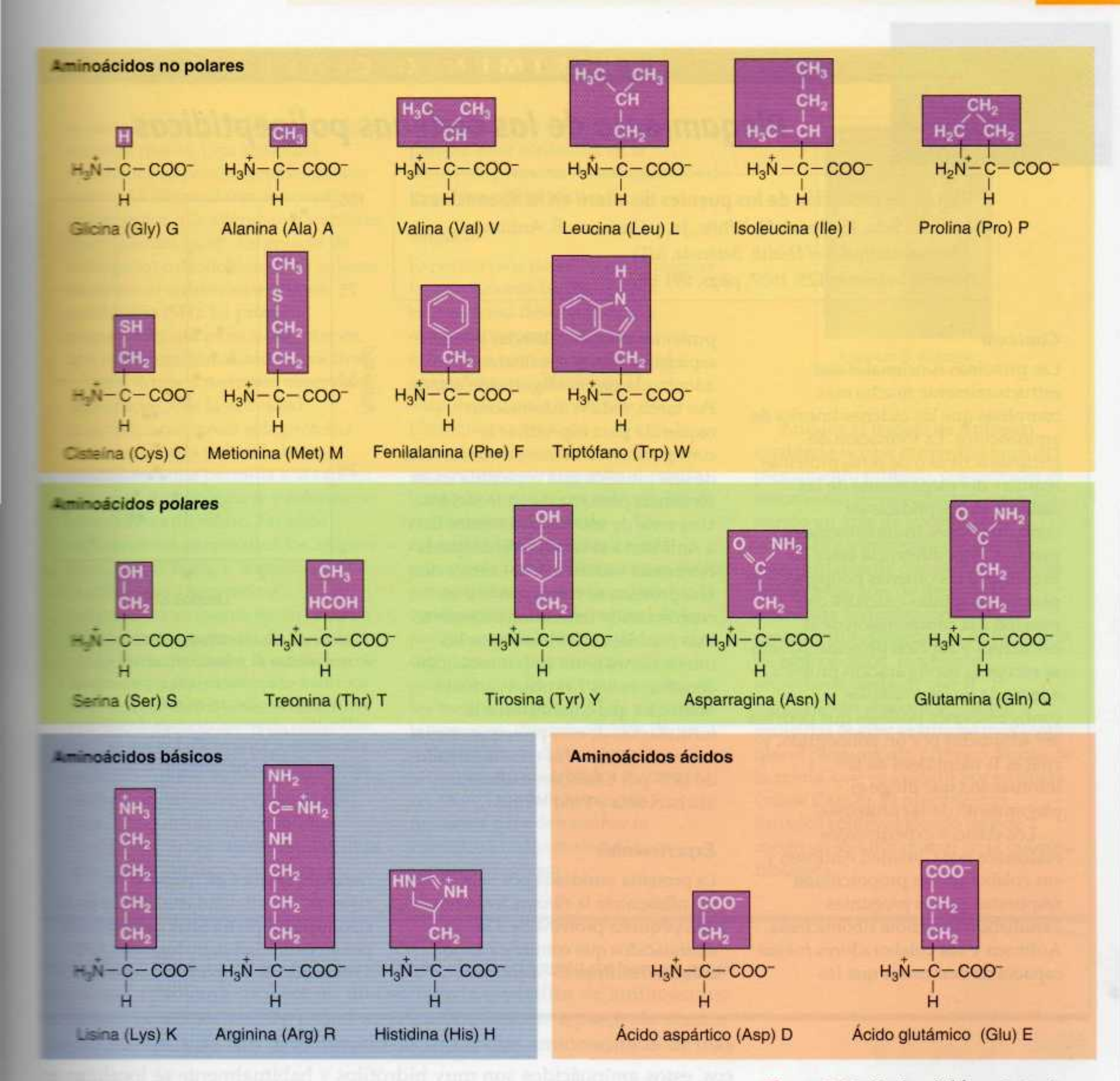


Figura 2.14 Aminoácidos. Se indican las abreviaturas de tres y una letra para cada aminoácido. Los aminoácidos se agrupan en cuatro amplias categorías dependiendo de las propiedades de sus cadenas laterales: no polares, polares, básicas y ácidas.

ácidos son hidrófobos y tienden a localizarse en la parte externa de las proteínas.

Los aminoácidos lisina, arginina e histidina tienen cadenas laterales con grupos básicos cargados. La lisina y la arginina son aminoácidos muy básicos, y sus cadenas laterales están cargadas positivamente dentro de la célula. Por tanto, son muy hidrófilos y se encuentran en contacto con el agua en la superficie de las proteínas. La histidina puede estar sin carga o cargada positivamente a pH fisiológico, así que con frecuencia desempeña un papel activo en reacciones enzimáticas que implican el intercambio de iones hidrógeno, como se trata en el Capítulo 3.

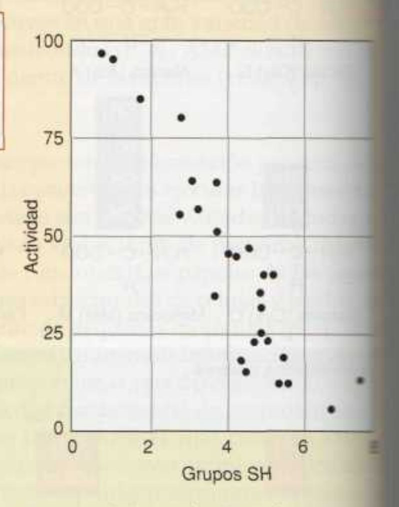
Por último, dos aminoácidos, el ácido aspártico y el ácido glutámico, tienen cadenas laterales ácidas que terminan en grupos carboxilo. Estos aminoácidos están cargados negativamente dentro de la célula y por tanto a menudo se denominan aspartato y glutamato. Como los aminoácidos bási-



EXPERIMENTO CLAVE

Plegamiento de las cadenas polipeptídicas

Rotura de reducción de los puentes disulfuro en la ribonucleasa
Michael Sela, Frederick H. White, Jr., y Christian B. Anfinsen
National Institutes of Health, Bethesda, MD
Science, Volumen 125, 1957, págs. 691-692



Resumen de los resultados de los experimentos de renaturalización. La actividad enzimática viene representada como una función del número de grupos sulfhidrilo presentes después de diversos tratamientos. La actividad se expresa como porcentaje de la actividad de la enzima nativa.

Contexto

Las proteínas funcionales son estructuralmente mucho más complejas que las cadenas lineales de aminoácidos. La formación de enzimas activas o de otras proteínas requiere del plegamiento de las cadenas polipeptídicas en configuraciones tridimensionales precisas. Esta diferencia entre las proteínas y las cadenas polipeptídicas plantea preguntas cruciales con relación a la comprensión de la estructura y función proteica. ¿Cómo se escoge la configuración proteica adecuada de las múltiples configuraciones posibles que podrían ser adoptadas por un polipéptido, y cuál es la naturaleza de la información que dirige el plegamiento de las proteínas?

Los clásicos experimentos realizados por Christian Anfinsen y sus colaboradores proporcionan respuestas a estas preguntas. Estudiando la enzima ribonucleasa, Anfinsen y sus colaboradores fueron capaces de demostrar que las proteínas desnaturalizadas pueden replegarse espontáneamente adoptando una configuración activa. Por tanto, toda la información requerida para especificar la configuración tridimensional correcta de una proteína está contenida en su secuencia primaria de aminoácidos. Una serie de estos experimentos llevó a Anfinsen a la conclusión de que la estructura tridimensional nativa de una proteína se corresponde a su conformación termodinámicamente más estable, determinada por las interacciones entre sus aminoácidos constituyentes. Las observaciones originales que condujeron a la formulación de este principio crucial fueron comunicadas en este artículo de 1957 por Christian Anfinsen, Michael Sela y Fred White.

Experimentos

La proteína estudiada por Sela, White y Anfinsen era la ribonucleasa bovina, una pequeña proteína de 124 aminoácidos que contiene cuatro enlaces disulfuro (S-S) entre las cadenas laterales de residuos de cisteína. La actividad enzimática de la ribonucleasa podía estar determinada por su habilidad para degradar ARN a nucleótidos, proporcionando una

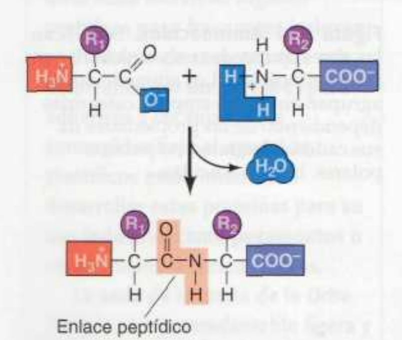


Figura 2.15 Formación de un enlace peptídico. El grupo carboxilo de un aminoácido se liga al grupo amino de otro.

cos, estos aminoácidos son muy hidrófilos y habitualmente se localizan en la superficie de las proteínas.

Los aminoácidos están unidos por **enlaces peptídicos** entre el grupo α amino de un aminoácido y el grupo α carboxilo del siguiente (Fig. 2.15). Los **polipéptidos** son cadenas lineales de aminoácidos, habitualmente de cientos o miles de aminoácidos de longitud. Cada cadena polipeptídica tiene dos extremos distintivos, uno terminando en un grupo α amino (el extremo amino, o N terminal) y el otro en un grupo α carboxilo (el extremo carboxilo o C, terminal). Los polipéptidos se sintetizan desde el extremo amino al carboxilo terminal, y la secuencia de aminoácidos en un polipéptido se escribe (por convención) en el mismo orden.

La característica definitoria de las proteínas es que son polipéptidos con secuencias de aminoácidos específicas. En 1953, Frederick Sanger fue el primero en determinar la secuencia completa de aminoácidos de una proteína, la hormona insulina. Se encontró que la insulina estaba constituida por dos cadenas polipeptídicas, unidas por enlaces disulfuro entre residuos de cis-

EXPERIMENTO CLAVE

evaluación sencilla de la función de la proteína nativa. Esta actividad enzimática se perdía completamente cuando la ribonucleasa se sometía a tratamientos que alteraban los enlaces no covalentes (p. ej., los enlaces de hidrógeno) o desdoblaban los enlaces disulfuro al reducirlos a grupos sulfhidrilo (SH). La proteína desnaturalizada parecía así estar en una conformación aleatoria inactiva.

Sela, White y Anfinsen observaron, algo crucial, que la actividad enzimática reaparece si la proteína desnaturalizada se incubaba en condiciones que permitía a la cadena polipeptídica replegarse y reformarse a los enlaces disulfuro. En estos experimentos se retiraban los agentes desnaturalizantes, y la enzima inactivada era incubada a temperatura ambiente en un tampón fisiológico en presencia de O_2. Este procedimiento llevó a la oxidación de los grupos sulfhidrilo y a la reformación de los enlaces disulfuro. Durante este proceso, la enzima recuperó su actividad catalítica, indicando que se había replegado a su configuración nativa (véase figura). Debido a que no estaba presente ningún otro componente celular, toda la información requerida para el plegamiento proteico adecuado parecía estar contenida en la secuencia primaria de aminoácidos de la cadena polipeptídica.

Impacto

Experimentos posteriores definieron las condiciones bajo las que la ribonucleasa desnaturalizada recuperaba completamente su estructura nativa y su actividad enzimática, estableciendo la «hipótesis termodinámica» del plegamiento proteico —esto es, la estructura nativa tridimensional de una proteína corresponde al estado termodinámicamente más estable en condiciones fisiológicas—. La estabilidad termodinámica está gobernada por las interacciones de los aminoácidos constitutivos, así que la configuración tridimensional de las proteínas está determinada directamente por su secuencia de aminoácidos. Puesto que el orden de los nucleótidos en el ADN especifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, se deduce que la secuencia de nucleótidos de un gen contiene toda la información necesaria para determinar la estructura tridimensional de su producto proteico.



Christian B. Anfinsen

Aunque el trabajo de Anfinsen estableció la base termodinámica del plegamiento proteico, comprender el mecanismo de este proceso continúa siendo un área de investigación activa. El plegamiento proteico es extremadamente complejo, y todavía somos incapaces de deducir la estructura tridimensional de una proteína directamente de su secuencia de aminoácidos. También es importante destacar que el plegamiento espontáneo de las proteínas *in vitro* es mucho más lento que el plegamiento proteico dentro de la célula, que es asistido por enzimas (véase Cap. 8). El plegamiento proteico continúa siendo de este modo un desafío central en la química biológica.

teína (Fig. 2.16). Lo que era más importante, el experimento de Sanger reveló que cada proteína consiste en una secuencia específica de aminoácidos. Actualmente las secuencias proteicas se suelen deducir a partir de secuencias de ARNm, y se han determinado las secuencias aminoacídicas de más

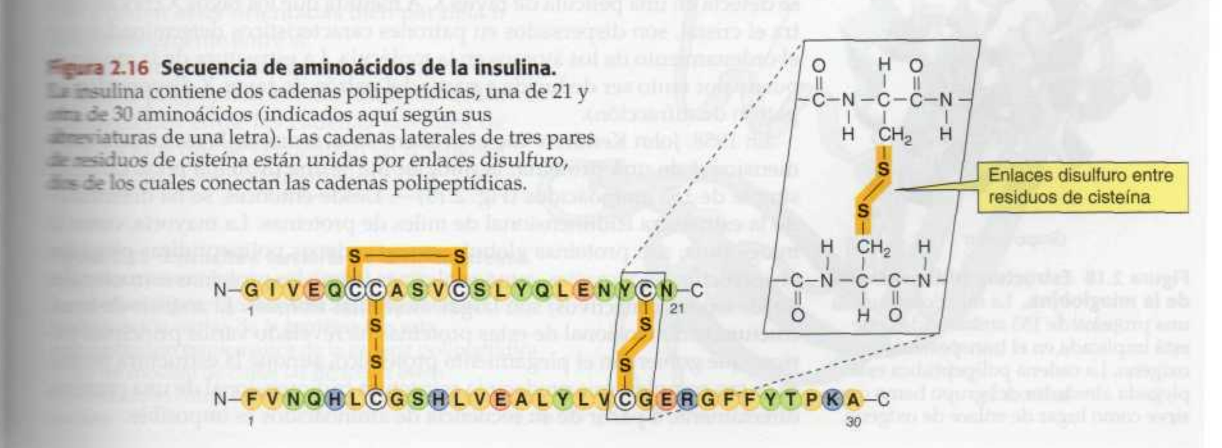


Figura 2.16 Secuencia de aminoácidos de la insulina. La insulina contiene dos cadenas polipeptídicas, una de 21 y otra de 30 aminoácidos (indicados aquí según sus abreviaturas de una letra). Las cadenas laterales de tres pares de residuos de cisteína están unidas por enlaces disulfuro, dos de los cuales conectan las cadenas polipeptídicas.

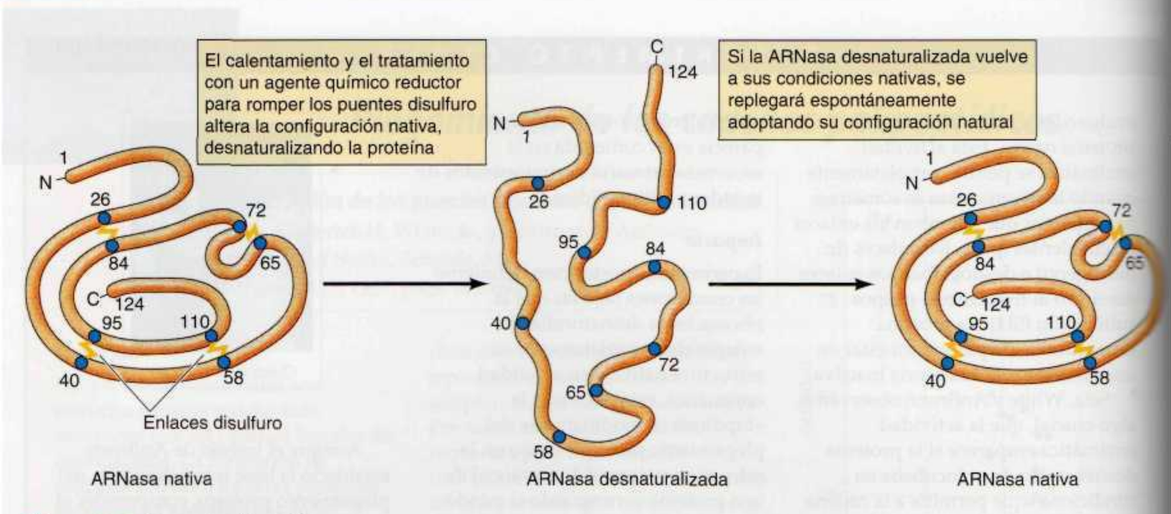


Figura 2.17 Desnaturalización y replegamiento proteico. La ribonucleasa (ARNasa) es una proteína de 124 aminoácidos (indicados por números). La proteína normalmente está plegada en su configuración natural, que contiene cuatro enlaces disulfuro (indicados como círculos pareados que representan residuos de cisteína).

de 100.000 proteínas. Cada una consiste en una secuencia única de aminoácidos, determinada por el orden de los nucleótidos en un gen (véase Cap. 4).

La secuencia de aminoácidos de una proteína es sólo el primer elemento de su estructura. En vez de ser cadenas prolongadas de aminoácidos, las proteínas adoptan configuraciones tridimensionales características que son cruciales para su función. Estas configuraciones tridimensionales de las proteínas son el resultado de las interacciones entre sus aminoácidos constituyentes, así que la forma de las proteínas viene determinada por su secuencia de aminoácidos. Esto fue demostrado por primera vez por los experimentos de Christian Anfinsen en los que alteró la estructura tridimensional de las proteínas mediante tratamientos tales como el calentamiento, que rompen los enlaces no covalentes —un proceso denominado desnaturalización (Fig. 2.17)—. Después de la incubación en condiciones más favorables, dichas proteínas desnaturalizadas con frecuencia regresan espontáneamente a sus configuraciones nativas, indicando que estas configuraciones están determinadas directamente por la secuencia de aminoácidos.

La estructura tridimensional de las proteínas se analiza con mayor frecuencia por **cristalografía de rayos X**, una técnica de alta resolución que puede determinar el ordenamiento de átomos individuales dentro de una molécula. Se dirige un haz de rayos X a los cristales de la proteína que se desea analizar, y el patrón de rayos X que pasan a través del cristal proteínico se detecta en una película de rayos X. A medida que los rayos X chocan contra el cristal, son dispersados en patrones característicos determinados por el ordenamiento de los átomos en la molécula. La estructura de la molécula puede por tanto ser deducida a partir del patrón de rayos X dispersados (el patrón de difracción).

En 1958, John Kendrew fue el primero en determinar la estructura tridimensional de una proteína, la mioglobina —una proteína relativamente simple de 153 aminoácidos (Fig. 2.18)—. Desde entonces, se ha determinado la estructura tridimensional de miles de proteínas. La mayoría, como la mioglobina, son proteínas globulares con cadenas polipeptídicas plegadas en estructuras compactas, aunque algunas (como las proteínas estructurales de los tejidos conectivos) son largas moléculas fibrosas. El análisis de la estructura tridimensional de estas proteínas ha revelado varios principios básicos que gobiernan el plegamiento proteínico, aunque la estructura proteica es tan compleja que predecir la estructura tridimensional de una proteína directamente a partir de su secuencia de aminoácidos es imposible.

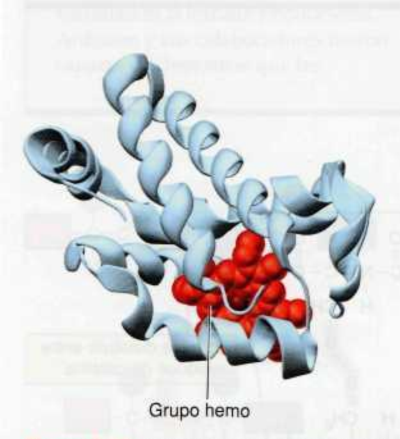


Figura 2.18 Estructura tridimensional de la mioglobina. La mioglobina es una proteína de 153 aminoácidos que está implicada en el transporte de oxígeno. La cadena polipeptídica está plegada alrededor del grupo hemo que sirve como lugar de enlace de oxígeno.

Hélice α

Enlace de hidrógeno

Hoja β

Enlace de hidrógeno

Figura 2.19 Estructura secundaria de las proteínas. Los tipos más comunes de estructura secundaria son la hélice α y la hoja β. En la hélice α, los enlaces de hidrógeno se forman entre grupos CO y NH de enlaces peptídicos separados por cuatro residuos de aminoácidos. En la hoja β, los enlaces de hidrógeno conectan dos partes de una cadena polipeptídica que se encuentran una junto a otra. Las cadenas laterales de los aminoácidos no se muestran.

La estructura proteica generalmente se describe en cuatro niveles. La **estructura primaria** de una proteína es la secuencia de aminoácidos de su cadena polipeptídica. La **estructura secundaria** es el ordenamiento regular de aminoácidos dentro de regiones localizadas del polipéptido. Dos tipos de estructura secundaria, que fueron propuestos por primera vez por Linus Pauling y Robert Corey en 1951, son particularmente comunes: la **hélice α** y la **hoja β**. Ambas estructuras secundarias se mantienen por enlaces de hidrógeno entre los grupos CO y NH de los enlaces peptídicos. La hélice α se forma cuando una región de una cadena polipeptídica se enrolla sobre sí misma, con el grupo CO de un enlace peptídico formando un enlace de hidrógeno con el grupo NH de un enlace peptídico situado cuatro residuos más abajo de la cadena lineal polipeptídica (Fig. 2.19). En contraste, la hoja β se forma cuando dos partes de una cadena polipeptídica se encuentran una junto a otra con enlaces de hidrógeno entre ellas. Estas hojas β pueden formarse entre varias hebras polipeptídicas, que pueden estar orientadas bien paralela o antiparalelamente entre sí.

La **estructura terciaria** es el plegamiento de la cadena polipeptídica como resultado de las interacciones entre las cadenas laterales de aminoácidos que se encuentran en diferentes regiones de la secuencia primaria (Fig. 2.20).

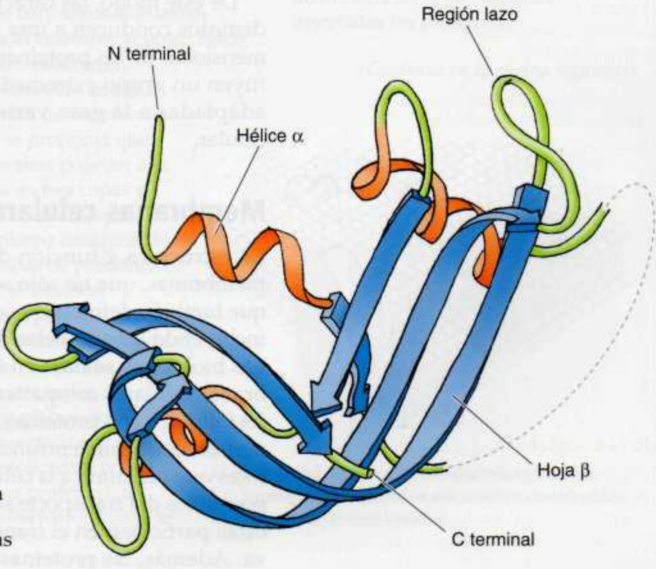


Figura 2.20 Estructura terciaria de la ribonucleasa. Regiones de estructura secundaria de hélices α y hojas β conectadas por regiones lazo, se pliegan en la configuración nativa de la proteína. En esta representación esquemática de la cadena polipeptídica como un modelo de cinta, las hélices α están representadas como espirales y las hojas β como flechas anchas.

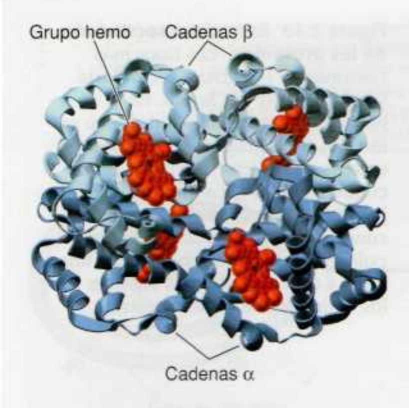


Figura 2.21 Estructura cuaternaria de la hemoglobina. La hemoglobina se compone de cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales está ligada a un grupo hemo. Las dos cadenas α y las dos cadenas β son idénticas.

En la mayoría de las proteínas, combinaciones de hélices α y hojas β, conectadas por regiones lazo de la cadena polipeptídica, se pliegan en estructuras globulares compactas denominadas **dominios**, que son las unidades básicas de la estructura terciaria. Las proteínas pequeñas, como la ribonucleasa o la mioglobina, contienen solamente un único dominio; las proteínas más grandes pueden contener varios dominios diferentes, que frecuentemente están relacionados con funciones características.

Un determinante crucial de la estructura terciaria es la localización de los aminoácidos hidrófobos en el interior de la proteína y de los aminoácidos hidrófilos en la superficie, donde interaccionan con el agua. El interior de las proteínas plegadas está constituido de este modo principalmente de aminoácidos hidrófobos organizados en hélices α y hojas β; estas estructuras secundarias se encuentran en el centro hidrófobo de las proteínas porque los enlaces de hidrógeno neutralizan el carácter polar de los grupos CO y NH de la columna vertebral polipeptídica. Las regiones lazo que conectan los elementos de la estructura secundaria se encuentran en la superficie de las proteínas plegadas, donde los componentes polares de los enlaces peptídicos forman enlaces de hidrógeno con el agua o con las cadenas laterales de los aminoácidos hidrófilos. Las interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos polares (enlaces de hidrógeno y enlaces iónicos) en la superficie proteica son también importantes determinantes de la estructura terciaria. Además, los enlaces disulfuro covalentes entre grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína estabilizan la estructura plegada de muchas proteínas de la superficie celular o de secreción.

El *cuarto nivel de la estructura proteica*, la **estructura cuaternaria**, consiste en las interacciones entre diferentes cadenas polipeptídicas en proteínas compuestas de más de un polipéptido. La hemoglobina, por ejemplo, está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas que se mantienen unidas por el mismo tipo de interacciones que mantienen la estructura terciaria (Fig. 2.21).

De este modo, las características químicas propias de los 20 aminoácidos distintos conducen a una variación considerable en la configuración tridimensional de las proteínas plegadas. En consecuencia, las proteínas constituyen un grupo extremadamente complejo y variado de macromoléculas, adaptadas a la gran variedad de tareas que llevan a cabo en la biología celular.

Membranas celulares

La estructura y función de las células dependen de forma crucial de las membranas, que no sólo separan el interior de la célula de su entorno sino que también definen los compartimentos internos de las células eucariotas, incluyendo las organelas de núcleo y citoplasma. La formación de membranas biológicas se basa en las propiedades de los lípidos, y todas las membranas celulares comparten una misma organización estructural: bicapas de fosfolípidos con proteínas asociadas. Estas proteínas de membrana son responsables de muchas funciones especializadas; algunas actúan como receptores que permiten a la célula responder a señales externas, algunas son responsables del transporte selectivo de moléculas a través de la membrana, y otras participan en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa. Además, las proteínas de membrana controlan las interacciones entre



EXPERIMENTO CLAVE

Estructura de las membranas celulares

El modelo del mosaico fluido para la estructura de las membranas celulares

S. J. Singer y Garth L. Nicolson

University of California en San Diego y el Salk Institute for Biological Sciences, La Jolla, CA

Science, Volumen 175, 1972, págs. 720-731



S. J. Singer



Garth L. Nicolson

Contexto

Las membranas celulares juegan papeles centrales en prácticamente todos los aspectos de la biología celular, funcionando como límites de los orgánulos subcelulares de las células eucariotas además de definir a la propia célula separando su contenido del medio externo. La comprensión de la estructura y organización de las membranas celulares era, por tanto, un paso crítico en el análisis de la base molecular del comportamiento celular. En los años 60, se sabía que las membranas celulares estaban compuestas por proteínas y lípidos pero no estaba claro cómo estaban organizadas estas moléculas. Además, había una gran variación entre las composiciones de proteína y lípidos entre las diferentes membranas celulares, dando lugar a que algunos investigadores pensasen que las diferentes membranas podrían no compartir una organización estructural común.

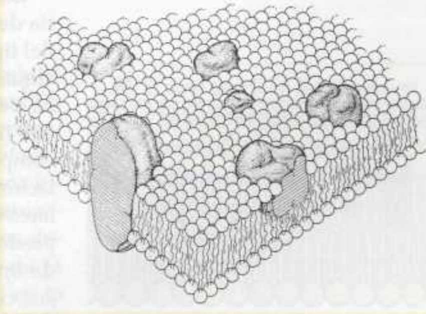
Por el contrario, Jonathan Singer y Garth Nicolson se enfrentaron al problema de comprender la estructura de la membrana, basados en la premisa de que los mismos principios generales describirían la organización de lípidos y proteínas en todas las membranas celulares. Aplicaron los principios de termodinámica además de integrar una variedad de resultados experimentales para desarrollar el modelo del mosaico fluido —un modelo que se ha establecido en el tiempo para la comprensión de las diversas funciones de las membranas en la biología celular.

Experimentos

Las consideraciones de termodinámica fueron básicas para el desarrollo del modelo del mosaico fluido de Singer y Nicolson. En particular, pensaron que la estructura general de las membranas estaría determinada por una combinación de interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas. Estas interacciones fueron reconocidas como determinantes de la organización de bicapas de fosfolípidos, y Singer y Nicolson pensaron que interacciones similares gobernarían la organización de las proteínas de membrana. Propusieron, por tanto, que los residuos de aminoácidos apolares de las proteínas de membrana estarían secuestrados en el interior de la membrana, de forma similar a las cadenas de fosfolípidos de los ácidos grasos, mientras que los grupos polares de las proteínas estarían expuestos al ambiente acuoso. Estos argumentos estaban en contra del modelo anterior de estructura de membrana en el que se proponía que las membranas poseían una estructura en tres capas y consistía en una bicapa lipídica interna flanqueada por dos capas de proteínas.

Singer y Nicolson propusieron por el contrario, una estructura de mosaico, en el que las proteínas integrales de membrana globulares estaban insertadas en una bicapa fosfolipídica (véase figura). Las proteínas, al igual que los fosfolípidos, se postulaban como antipáticos, con regiones apolares insertadas en la bicapa lipídica y regiones polares expuestas hacia el medio acuoso. La bicapa lipídica se creía que constituía una matriz estructural de la membrana en la que estaban insertadas las proteínas.

(Continúa en la página siguiente)



El modelo del mosaico lípido-proteína globular. Las proteínas globulares se encuentran distribuidas en una matriz de fosfolípidos.

EXPERIMENTO CLAVE

Diversas líneas de evidencia experimental fueron citadas para apoyar el modelo del mosaico fluido. Primero la microscopia electrónica de membranas empleando la técnica de fractura por congelación proporcionó pruebas directas sugiriendo que las proteínas estaban incluidas en la bicapa lipídica (véase Fig. 1.36). Además, como predecía el modelo del mosaico fluido, las proteínas se encontraban distribuidas aleatoriamente en el plano de la membrana cuando eran detectadas mediante la tinción superficial de las células. Y, finalmente, como se verá en el Capítulo 13, los experimentos de Larry Frye y Michael Edidin demostraron que las proteínas podían moverse lateralmente a través de la membrana. Múltiples enfoques experimentales indicaron así que las proteínas de membrana estaban insertadas y capaces de moverse lateralmente a través de la bicapa lipídica, proporcionando un fuerte apoyo para el modelo del mosaico fluido para la estructura de membrana.

Impacto

El modelo del mosaico fluido de Singer y Nicolson ha sido apoyado de forma abundante por experimentación subsiguiente, y sigue representando nuestra comprensión básica de la estructura de la membrana celular. Dados los diversos papeles de las membranas en la biología celular, el modelo del mosaico fluido es, por tanto, fundamental para la comprensión de prácticamente todos los aspectos del comportamiento celular, incluyendo fenómenos tan diversos como el metabolismo energético, la acción hormonal y la transmisión de información entre células nerviosas en la sinapsis. Basado inicialmente en consideraciones termodinámicas de las propiedades de lípidos y proteínas, Singer y Nicolson desarrollaron un modelo de estructura de membrana que ha tenido gran impacto en todos los aspectos de la biología celular.

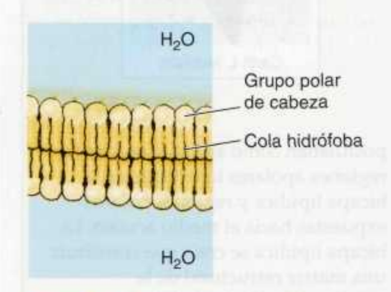


Figura 2.22 Bicapa fosfolipídica. Los fosfolípidos forman espontáneamente bicapas estables, con sus grupos polares de cabeza expuestos al agua y sus colas hidrófobas enterradas en el interior de la membrana.

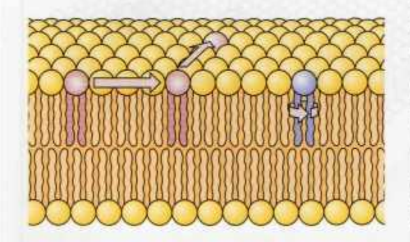


Figura 2.23 Movilidad de los fosfolípidos en una membrana. Fosfolípidos individuales pueden rotar y moverse lateralmente dentro de una bicapa.

células de organismos pluricelulares. La organización estructural común de las membranas subyace de este modo en una gran variedad de procesos biológicos y funciones especializadas de membrana, que se tratarán con detalle en otros capítulos.

Lípidos de membrana

Los bloques de construcción fundamentales de todas las membranas celulares son los fosfolípidos, que son moléculas anfipáticas, que consisten en dos cadenas de ácidos grasos hidrófobos ligadas a un grupo de cabeza hidrófilo que contiene fosfato (véase Fig. 2.7). Debido a que sus colas de ácidos grasos son escasamente solubles en agua, los fosfolípidos forman bicapas espontáneamente en soluciones acuosas, con las colas hidrófobas enterradas en el interior de la membrana y los grupos polares de cabeza expuestos en ambos lados, en contacto con el agua (Fig. 2.22). Dichas **bicapas fosfolipídicas** forman una barrera estable entre dos compartimentos acuosos y representan la estructura básica de todas las membranas biológicas.

Los lípidos constituyen aproximadamente el 50% de la masa de la mayoría de las membranas celulares, aunque esta proporción varía dependiendo del tipo de membrana. Las membranas plasmáticas, por ejemplo, son aproximadamente un 50% de lípidos y un 50% de proteínas. La membrana interna de la mitocondria, por otra parte, contiene una fracción inusualmente alta (aproximadamente el 75 %) de proteínas, reflejando la abundancia de complejos proteínicos implicados en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. La composición lipídica de las diferentes membranas celulares también varía (Tabla 2.1). La membrana plasmática de *E. coli* contiene predominantemente fosfatidiletanolamina, que constituye el 80% del total de lípidos. Las membranas plasmáticas de los mamíferos son más complejas, conteniendo cuatro fosfolípidos principales —fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina— que juntos constituyen entre el 50% y el 60% del total de lípidos de membrana. Además de los fosfolípidos, la membrana plasmática de las células animales contiene glucolípidos y colesterol, que generalmente corresponden a aproximadamente el 40% de las moléculas de lípidos totales.

Tabla 2.1 Composición lipídica de las membranas celulares[a]

Lípido	Membrana plasmática		Retículo endoplasmático rugoso	Membranas mitocondriales externas
	E. coli	Eritrocito		
Fosfatidilcolina	0	17	55	50
Fosfatidilserina	0	6	3	2
Fosfatidiletanolamina	80	16	16	23
Esfingomielina	0	17	3	5
Glucolípidos	0	2	0	0
Colesterol	0	45	6	<5

Fuente: Datos de P. L. Yeagle, 1993. *The Membranes of Cells*, 2.ª ed. San Diego, CA: Academic Press.
[a] La composición de la membrana está indicada como el porcentaje molar de los principales lípidos constituyentes.

Una importante propiedad de las bicapas lipídicas es que se comportan como fluidos bidimensionales en los que moléculas individuales (tanto lípidos como proteínas) son libres para rotar y moverse en direcciones laterales (Fig. 2.23). Esta fluidez es una propiedad crucial de las membranas y está determinada tanto por la temperatura como por la composición lipídica. Por ejemplo, las interacciones entre cadenas más cortas de ácidos grasos son más débiles que aquellas entre cadenas más largas, así que las membranas que contienen cadenas de ácidos grasos más cortas son menos rígidas y se mantienen fluidas a temperaturas más bajas. Los lípidos que contienen ácidos grasos insaturados incrementan de forma similar la fluidez de la membrana porque la presencia de dobles enlaces introduce curvamientos en las cadenas de ácidos grasos, haciendo más difícil que se empaqueten juntas.

Debido a su estructura de anillo hidrocarbonado (véase Fig. 2.9), el colesterol desempeña un papel importante en la determinación de la fluidez de la membrana. Las moléculas de colesterol se insertan en la bicapa con sus grupos polares hidroxilo próximos a los grupos de cabeza hidrofílicos de los fosfolípidos (Fig. 2.24). Los anillos hidrocarbonados rígidos del colesterol interactúan por tanto con las regiones de las cadenas de ácidos grasos que son adyacentes a los grupos de cabeza de los fosfolípidos. Esta interacción disminuye la movilidad de las porciones externas de las cadenas de ácidos grasos, haciendo que esta parte de la membrana sea más rígida. Por otra parte, la inserción del colesterol interfiere con las interacciones entre cadenas de ácidos grasos, manteniendo de este modo la fluidez de la membrana a temperaturas más bajas.

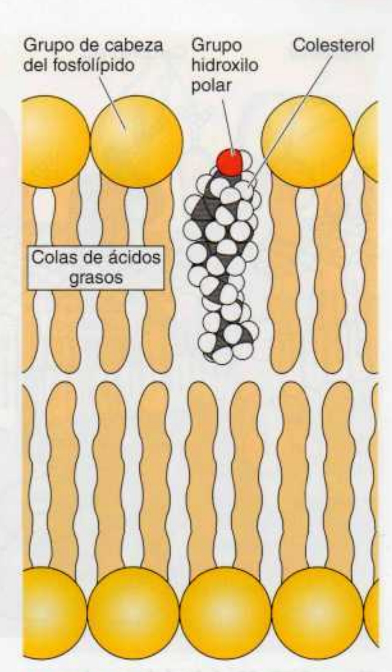


Figura 2.24 Inserción de colesterol en una membrana. El colesterol se inserta en la membrana con su grupo hidroxilo polar próximo a los grupos polares de cabeza de los fosfolípidos.

Proteínas de membrana

Las proteínas son el otro constituyente principal de las membranas celulares, constituyendo entre el 25% y el 75% de la masa de las diversas membranas de la célula. El modelo actual de la estructura de la membrana, propuesto por Jonathan Singer y Garth Nicolson en 1972, considera las membranas como un **mosaico fluido** en el que las proteínas están insertadas en una bicapa lipídica (Fig. 2.25). Mientras los fosfolípidos proporcionan la organización estructural básica de las membranas, las proteínas de membrana desempeñan las funciones específicas de las diferentes membranas de la célula. Estas proteínas se dividen en dos tipos generales, basándose en la naturaleza de su asociación con la membrana. Las **proteínas integrales de membrana** están embebidas directamente dentro de la bicapa lipídica. Las **proteínas periféricas de membrana** no están insertadas en la bicapa lipídica pero están asociadas con la membrana indirectamente, generalmente a través de interacciones con las proteínas integrales de membrana.

■ **¿Cómo perciben las plantas el frío? Las evidencias sugieren que las plantas detectan caídas de temperatura en parte detectando variaciones en la fluidez de sus membranas.**

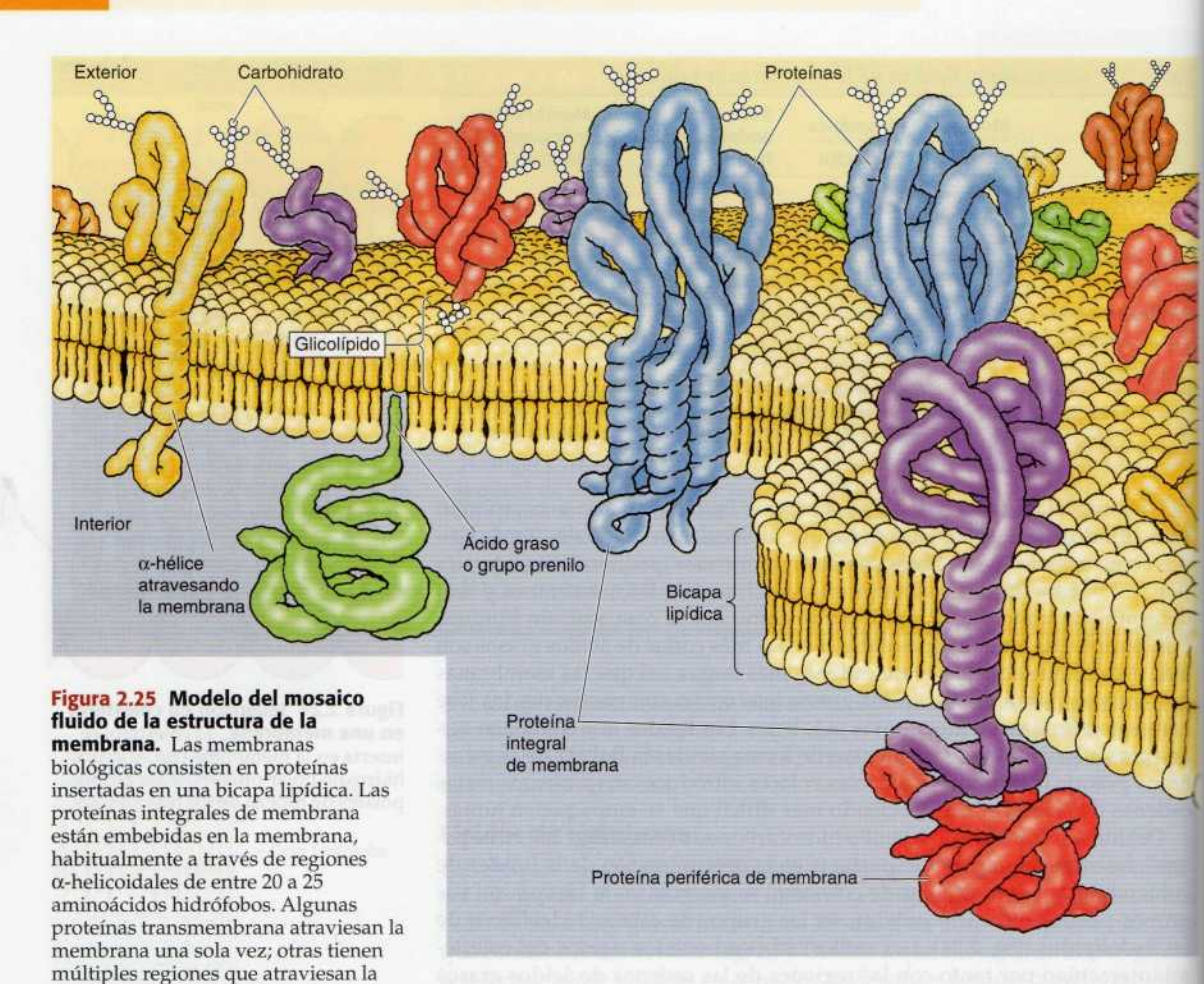


Figura 2.25 Modelo del mosaico fluido de la estructura de la membrana. Las membranas biológicas consisten en proteínas insertadas en una bicapa lipídica. Las proteínas integrales de membrana están embebidas en la membrana, habitualmente a través de regiones α-helicoidales de entre 20 a 25 aminoácidos hidrófobos. Algunas proteínas transmembrana atraviesan la membrana una sola vez; otras tienen múltiples regiones que atraviesan la membrana. Además, algunas proteínas están ancladas en la membrana a través de lípidos que están ligados de forma covalente a la cadena polipeptídica. Estas proteínas pueden estar ancladas a la vertiente extracelular de la membrana por glicolípidos o a la vertiente citosólica por ácidos grasos o grupos prenilo (véanse las estructuras en el Cap. 8). Las proteínas periféricas de membrana no están insertadas en la membrana pero están adheridas a través de interacciones con proteínas integrales de membrana.

Muchas proteínas integrales de membrana (llamadas **proteínas transmembrana**) atraviesan la bicapa lipídica, con partes expuestas en ambos lados de la membrana. Las partes de estas proteínas que atraviesan la membrana son habitualmente regiones α-helicoidales de entre 20 a 25 aminoácidos no polares. Las cadenas laterales hidrófobas de estos aminoácidos interaccionan con las cadenas de ácidos grasos de los lípidos de membrana, y la formación de una α-hélice neutraliza el carácter polar de los enlaces peptídicos, como se discute previamente en este capítulo con respecto al plegamiento de las proteínas. La única otra estructura proteica conocida que atraviesa bicapas lipídicas es el **barril-β**, formada por el plegamiento de láminas-β en una estructura semejante a un barril, que se encuentra en algunas proteínas transmembrana de bacterias, cloroplastos y mitocondrias (Fig. 2.26). Como los fosfolípidos, las proteínas transmembrana son moléculas anfipáticas, con sus partes hidrófilas expuestas al medio acuoso a ambos lados de la membrana. Algunas proteínas transmembrana atraviesan la membrana una sola vez; otras tienen múltiples regiones que atraviesan la membrana. La mayoría de las proteínas transmembrana de las membranas plasmáticas eucariotas han sido modificadas con la adición de carbohidratos, que están expuestos en la superficie de la célula y pueden participar en interacciones célula-célula.

Las proteínas también pueden estar ancladas en las membranas por lípidos que están ligados de forma covalente a la cadena polipeptídica (véase Cap. 8). Modificaciones lipídicas específicas anclan proteínas a las vertientes citosólica y extracelular de la membrana plasmática. Las proteínas pueden estar ancladas a la vertiente citosólica de la membrana bien por la adición de un ácido graso de 14 carbonos (ácido mirístico) a su extremo amino terminal o bien por la adición de un ácido graso de 16 carbonos (ácido palmítico) o de grupos prenilo de 15 ó 20 carbonos a las cadenas laterales de los residuos de cisteína. De forma alternativa, las proteínas son ancladas a la vertiente extracelular de la membrana plasmática a través de la adición de glicolípidos a su extremo carboxilo terminal.

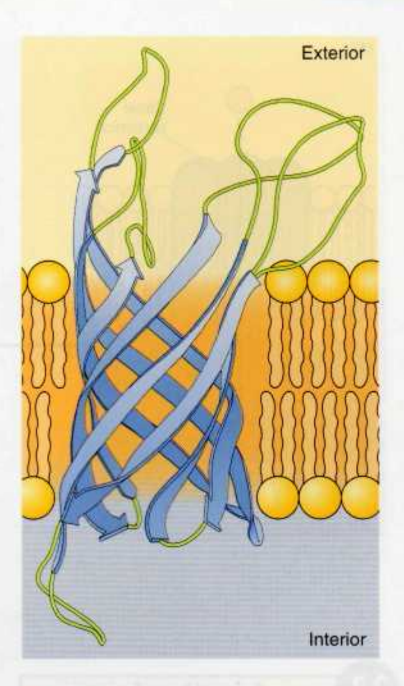


Figura 2.26 Estructura de un barril-β. Algunas proteínas transmembrana atraviesan la bicapa fosfolipídica como láminas-β plegadas en una estructura semejante a un barril.

Transporte a través de membranas celulares

La permeabilidad selectiva de las membranas biológicas a las moléculas pequeñas permite a la célula controlar y mantener su composición interna. Sólo las moléculas pequeñas no cargadas pueden difundir libremente a través de las bicapas de fosfolípidos (Fig. 2.27). Las moléculas pequeñas no polares, como el O_2 y el CO_2, son solubles en la bicapa lipídica y por tanto pueden cruzar fácilmente las membranas celulares. Las moléculas polares pequeñas no cargadas, como el H_2O, también pueden difundir a través de las membranas, pero moléculas polares no cargadas mayores, como la glucosa, no pueden. Las moléculas cargadas, como los iones, son incapaces de difundir a través de una bicapa de fosfolípidos independientemente de su tamaño; incluso los iones H^+ no pueden cruzar una bicapa lipídica por difusión libre.

Aunque los iones y la mayoría de las moléculas polares no pueden difundir a través de una bicapa lipídica, muchas de estas moléculas (como la glucosa) son capaces de atravesar las membranas celulares. Estas moléculas pasan a través de las membranas gracias a la actuación de proteínas específicas transmembrana, que actúan como transportadores. Dichas proteínas de transporte determinan la permeabilidad selectiva de las membranas celulares y de este modo desempeñan un papel crucial en la función de la membrana. Contienen múltiples regiones que atraviesan la membrana formando un conducto a través de la bicapa lipídica, permitiendo que moléculas polares o cargadas atraviesen la membrana por un poro proteínico sin interaccionar con las cadenas hidrófobas de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana.

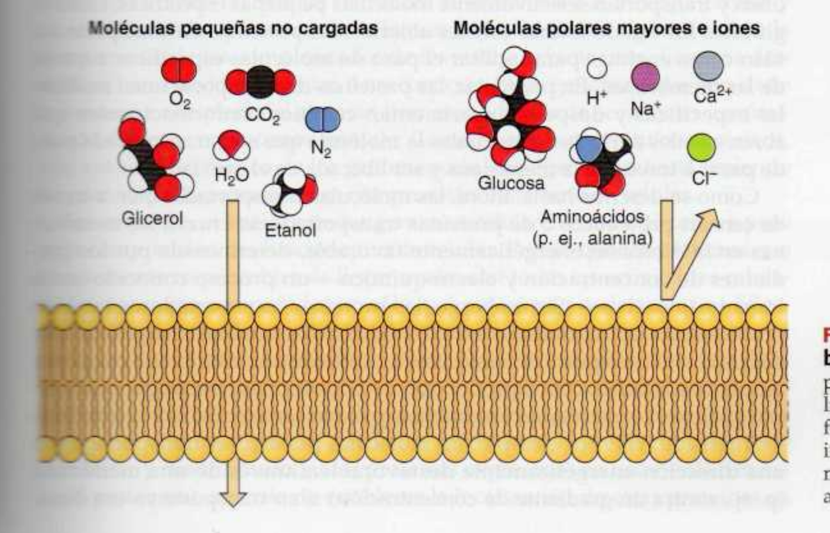
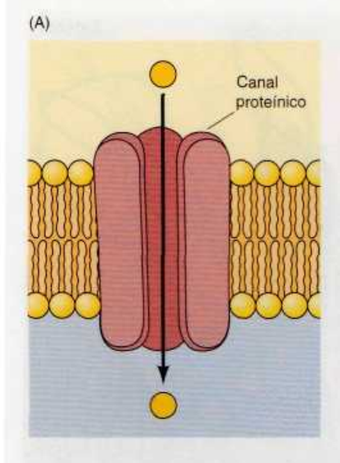


Figura 2.27 Permeabilidad de la bicapa de fosfolípidos. Moléculas pequeñas no cargadas pueden difundir libremente a través de una bicapa de fosfolípidos. Sin embargo, la bicapa es impermeable a moléculas polares mayores (como la glucosa y los aminoácidos) y a los iones.



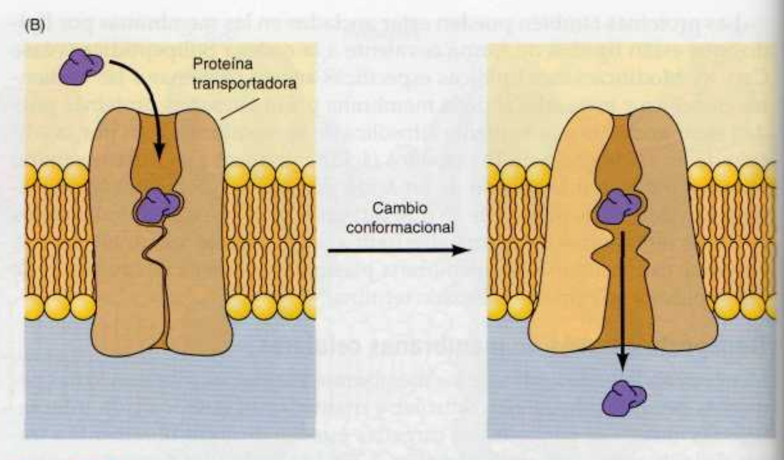


Figura 2.28 Canales proteínicos y proteínas de transporte. (A) Los canales proteínicos forman poros abiertos a través de los cuales las moléculas del tamaño apropiado (p. ej., iones) pueden cruzar la membrana. (B) Las proteínas transportadoras unen selectivamente las pequeñas moléculas que serán transportadas y entonces experimentan un cambio conformacional para liberar la molécula al otro lado de la membrana.

> **2.2 Animación web**
> **Transporte pasivo**
> La difusión pasiva y la difusión facilitada son tipos de transporte pasivo por los que algunas moléculas atraviesan las membranas biológicas.

Como se trata en detalle en el Capítulo 13, hay dos tipos principales de proteínas de transporte de membrana (Fig. 2.28). Los **canales proteínicos** forman poros abiertos a través de la membrana, permitiendo libremente el paso de cualquier molécula del tamaño adecuado. Los canales iónicos, por ejemplo, permiten el paso de iones inorgánicos como Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^- a través de la membrana plasmática. Los poros formados por estos canales proteínicos no están permanentemente abiertos; más bien, pueden ser abiertos o cerrados selectivamente en respuesta a señales extracelulares, permitiendo a la célula controlar el movimiento de iones a través de la membrana. Estos canales iónicos regulados han sido estudiados especialmente bien en células nerviosas y musculares, donde median la transmisión de señales electroquímicas.

En contraste con los canales proteínicos, las **proteínas transportadoras** unen y transportan selectivamente moléculas pequeñas específicas, como la glucosa. En vez de formar canales abiertos, las proteínas de transporte actúan como enzimas para facilitar el paso de moléculas específicas a través de las membranas. En particular, las proteínas de transporte unen moléculas específicas y después experimentan cambios conformacionales que abren canales a través de los cuales la molécula que será transportada puede pasar a través de la membrana y ser liberada en el otro lado.

Como se describe hasta ahora, las moléculas transportadas bien a través de canales proteínicos o de proteínas transportadoras cruzan las membranas en la dirección energéticamente favorable, determinada por los gradientes de concentración y electroquímico —un proceso conocido como **transporte pasivo**—. Sin embargo, las proteínas transportadoras también *proporcionan un mecanismo a través del cual los cambios energéticos asociados con el transporte de moléculas a través de una membrana puede ser acoplado a la utilización o producción de otras formas de energía metabólica*, igual que las reacciones enzimáticas pueden ser acopladas a la hidrólisis o síntesis de ATP. Por ejemplo, las moléculas pueden ser transportadas en una dirección energéticamente desfavorable a través de una membrana (p. ej., contra un gradiente de concentración) si su transporte en esa direc-

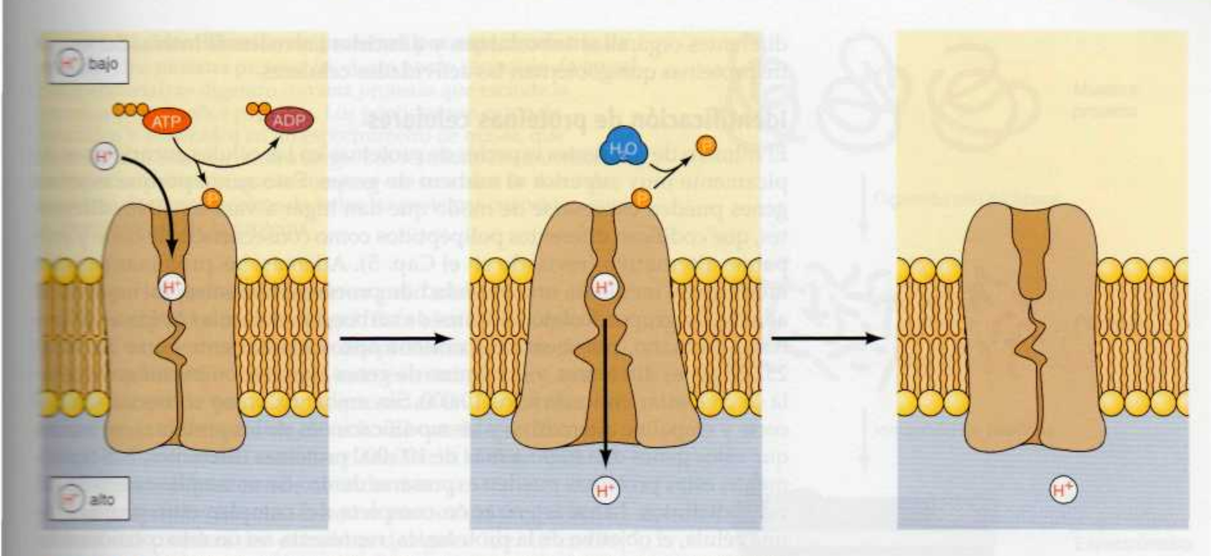


Figura 2.29 Modelo de transporte activo. La energía derivada de la hidrólisis de ATP es empleada para transportar H^+ en contra de un gradiente electroquímico (de una baja a una alta concentración de H^+). La unión de H^+ está acompañada por la fosforilación de la proteína de transporte, lo que induce un cambio conformacional que promueve el transporte de H^+ contra el gradiente electroquímico. La liberación de H^+ y la hidrólisis del grupo fosfato ligado restablecen entonces el transportador a su conformación original.

ción está acoplado a la hidrólisis de ATP como fuente de energía —un proceso denominado **transporte activo** (Fig. 2.29)—. Las proteínas de membrana pueden por tanto emplear energía libre almacenada como ATP para controlar la composición interna de la célula.

Proteómica: el análisis a gran escala de las proteínas celulares

Durante los últimos años se han producido un número de cambios importantes en el modo en que los científicos se enfrentan a la biología celular y molecular, con la aplicación de enfoques experimentales a gran escala a la comprensión de las complejidades de los sistemas biológicas. Los más dramáticos han sido los proyectos de secuenciación de genomas, que han dado la secuencia completa del genoma humano, además de secuencias genómicas de diversos organismos modelo. Como se verá en capítulos sucesivos, este análisis sistemático de los genomas celulares (**genómica**) está teniendo un gran impacto sobre nuestra comprensión de la función celular.

Sin embargo, el análisis de los genomas celulares es sólo el primer paso en la comprensión del funcionamiento celular. Puesto que las proteínas son directamente responsables de llevar a cabo casi todas las actividades celulares, es necesario comprender no sólo qué proteínas pueden estar codificadas por el genoma de una célula, sino también qué proteínas se expresan y cómo funcionan en el interior de la célula. Una comprensión completa de la función celular, por tanto, requiere no sólo la secuencia de su genoma, sino también el análisis sistemático de su complemento proteico. Este análisis a gran escala de las proteínas celulares (**proteómica**) posee el objetivo de identificar y cuantificar todas las proteínas expresadas en una célula concreta (el **proteoma**), además de establecer la localización de estas proteínas en

diferentes orgánulos subcelulares y dilucidar las redes de interacciones entre proteínas que gobiernan las actividades celulares.

Identificación de proteínas celulares

El número de diferentes especies de proteínas en las células eucariotas es típicamente muy superior al número de genes. Esto surge porque muchos genes pueden expresarse de modo que dan lugar a varios ARNm diferentes, que codifican diferentes polipéptidos como consecuencia de corte y empalme alternativo (revisado en el Cap. 5). Además, las proteínas pueden modificarse mediante una variedad de procesos diferentes, incluyendo la adición de grupos fosfato, hidratos de carbono y moléculas lipídicas. El genoma humano, por ejemplo, contiene aproximadamente entre 20.000 y 25.000 genes diferentes, y el número de genes expresados en cualquier célula se cree estar en torno a los 10.000. Sin embargo, como consecuencia del corte y empalme alternativo y las modificaciones de las proteínas, se estima que estos genes dan lugar a más de 100.000 proteínas diferentes. Adicionalmente, estas proteínas pueden expresarse dentro de un amplio rango de niveles distintos. La caracterización completa del complemento proteico de una célula, el objetivo de la proteómica, representa así un reto considerable. A pesar de que se ha conseguido un progreso importante en los últimos años, siguen existiendo grandes obstáculos que se deben superar antes de que se pueda conseguir una caracterización completa de los proteomas celulares.

La primera técnica desarrollada para la separación a gran escala de proteínas celulares fue la **electroforesis en gel bidimensional** (Fig. 2.30), que permanece una estrategia bien establecida dentro de los experimentos de proteómica. Una mezcla de proteínas celulares es sometida en primer lugar a una electroforesis en un tubo con un gradiente de pH entre un extremo y otro. Cada proteína migra de acuerdo con su carga hasta que alcanza el pH al cual la carga de la proteína es neutralizada, lo que está determinado por el contenido en aminoácidos básicos y ácidos de la proteína. Las proteínas a continuación se someten a electroforesis en una segunda dimensión bajo condiciones en las que se separan de acuerdo con su tamaño molecular, de



Figura 2.30 Electroforesis en gel bidimensional. Una mezcla de proteínas celulares es sometida en primer lugar a una electroforesis en gradiente de pH para que se separen de acuerdo con su carga (eje horizontal). Las proteínas a continuación sufren otra electroforesis en una segunda dimensión bajo condiciones donde se separan en función de su tamaño (eje vertical). El gel se tiñe para mostrar puntos que corresponden a proteínas concretas. El ejemplo mostrado es un gel de proteínas procedentes de *E. coli*. (De P. H. O'Farrell. 1975. *J. Biol. Chem.* 250: 4007; cortesía de Patrick O'Farrell.)

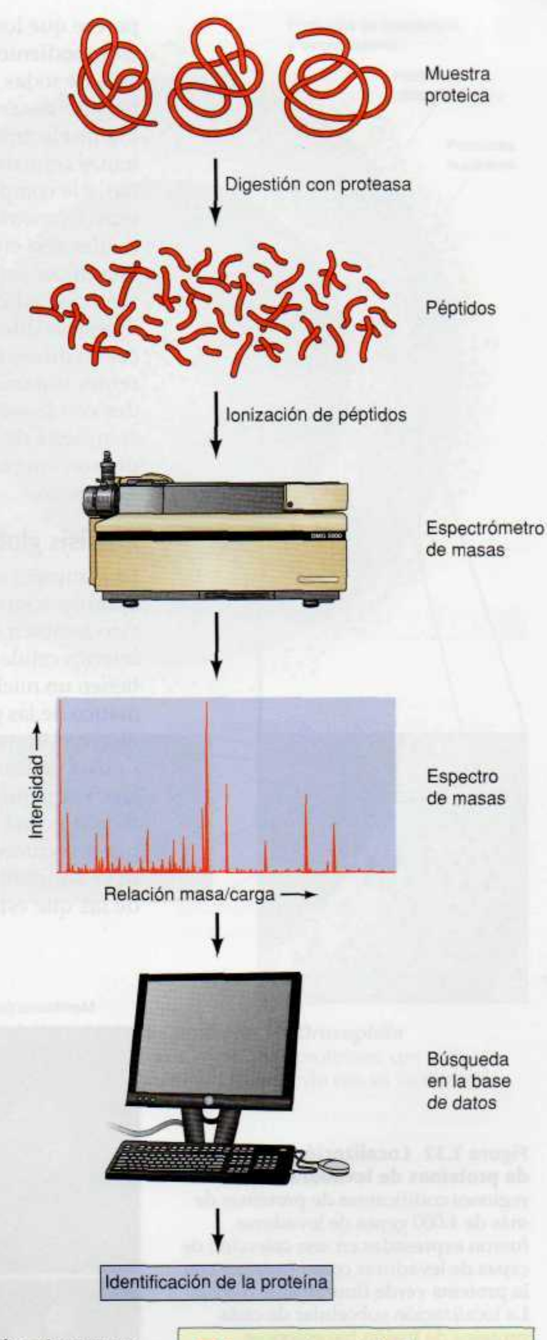


Figura 2.31 Identificación de proteínas por espectrometría de masas. Una muestra proteica (p. ej., un punto escindido de un gel bidimensional) es digerido con una proteasa que escinde la proteína en pequeños péptidos. Los péptidos son entonces ionizados y analizados en un espectrómetro de masas, que determina su relación masa a carga. Los resultados se muestran en un espectro de masas, que se compara con una base de datos de espectros de masas teóricos de todas las proteínas conocidas, para la identificación de la proteína.

forma que las proteínas de menor peso molecular se mueven más rápido a través del gel. Esta técnica es capaz de resolver varios miles de especies proteicas a partir de un extracto celular. Sin embargo, esto es mucho menor que el número total de proteínas expresadas en las células de mamífero y es importante el hecho de que la electroforesis en gel bidimensional está desviada hacia la detección de las proteínas celulares más abundantes.

Las proteínas detectadas como puntos en un gel bidimensional pueden ser extraídas del gel e identificadas mediante **espectrometría de masas**, desarrollada durante los años 90 como una potente herramienta para la identificación de proteínas (Fig. 2.31). El punto proteico escindido de un gel es digerido con una proteasa para cortar dicha proteína en pequeños fragmentos proteicos (péptidos) de aproximadamente unos 20 aminoácidos de largo. Una proteasa muy utilizada con este fin es la tripsina, que corta proteínas en extremo carboxilo-terminal de los residuos de lisina y arginina. Los péptidos son ionizados mediante irradiación con láser o mediante su paso por un campo de elevado potencial eléctrico e introducidos en un espectrómetro de masas, que mide la relación masa/carga de cada péptido. Esto genera un espectro de masas en el que los péptidos individuales obtenidos se correlacionan con un pico que corresponde a su relación masa/carga. Pueden emplearse algoritmos para comparar los espectros de masas determinados experimentalmente con una base de datos de espectros de masa teóricos que representan péptidos digeridos por tripsina de todas las proteínas conocidas, permitiendo la identificación de la proteína desconocida. De forma alternativa, puede obtenerse una información más detallada sobre la secuencia mediante la espectrometría de masas en tándem. En esta técnica, los péptidos individuales del espectro de masas inicial son seleccionados automáticamente para entrar en una «célula de colisión», en la que son parcialmente degradados por rotura aleatoria de los enlaces peptídicas. A continuación, se obtiene un segundo espectro de masas de los productos de degradación parcial de cada péptido, del que puede deducirse la secuencia de aminoácidos del péptido. Las modificaciones proteicas, como la fosforilación, también pueden detectarse porque alteran la masa del aminoácido modificado.

A pesar de ser muy potente, la técnica de gel bidimensional/espectrometría de masas es limitada. Como se ha indicado anteriormente, los geles bidimensionales favorecen la detección de las proteínas celulares más abundantes, y las proteínas de membrana son especialmente difíciles de resolver mediante esta técnica. Como consecuencia de estas limitaciones,

■ **La espectrometría de masas posee muchas aplicaciones, incluyendo el análisis de muestras de sangre de atletas para detectar la presencia de algunos compuestos estimuladores del rendimiento.**

parece que los geles bidimensionales son capaces de resolver proteínas correspondientes sólo a viarios cientos de genes, representando menos de un 10% de todas las proteínas celulares. Una técnica alternativa de «escopeta» ha sido desarrollada para eliminar la separación inicial de proteínas mediante electroforesis en gel bidimensional. En esta técnica, la mezcla de proteínas celulares sin fraccionar es digerida mediante proteasa (p. ej., tripsina), y la compleja mezcla de péptidos es sometida a secuenciación mediante espectrometría de masas en tándem. Las secuencias de los péptidos individuales son entonces empleados para la búsqueda de bases de datos para identificar las proteínas presentes en la mezcla inicial. Se han desarrollado métodos adicionales para comparar las cantidades de proteínas en dos muestras diferentes, permitiendo el análisis cuantitativo de niveles proteicos en diferentes tipos de células o en células que han sido sometidas a diferentes tratamientos. A pesar de que existen diversos problemas relacionados con la sensibilidad y precisión de estas técnicas, el análisis de mezclas complejas de proteínas mediante la espectrometría de masas de escopeta proporciona una potente técnica para el análisis sistemático de proteínas celulares.

Análisis global de la localización de proteínas

La comprensión de la función de las células eucariotas necesitará no sólo la identificación de las proteínas expresadas en un determinado tipo celular, sino también la caracterización de la localización de dichas proteínas en el interior celular. Como se ha visto en el Capítulo 1, las células eucariotas contienen un núcleo y una variedad de orgánulos subcelulares. El análisis sistemático de las proteínas presentes en estos orgánulos se ha convertido en un objetivo importante para los estudios proteómicos de la biología celular.

Una de las técnicas de análisis global de localización de proteínas es aislar el orgánulo de interés mediante el fraccionamiento subcelular, como se ha visto en el Capítulo 1. Las proteínas presentes en los orgánulos aislados pueden entonces ser analizadas mediante espectrometría de masas, la cual se ve simplificada puesto que cualquier orgánulo contiene menos proteínas de las que estarían presentes en extractos de células totales. Las mitocon-

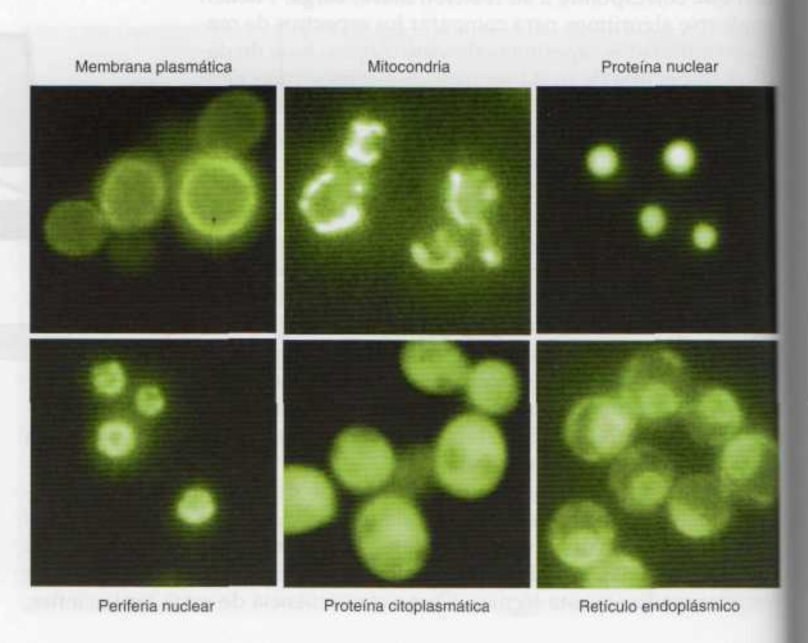


Figura 2.32 Localización subcelular de proteínas de levaduras. Las regiones codificantes de proteínas de más de 4.000 genes de levaduras fueron expresadas en una colección de cepas de levaduras como fusiones con la proteína verde fluorescente (GFP). La localización subcelular de cada proteína de fusión fue entonces determinada mediante microscopia de fluorescencia. Las micrografías mostradas ilustran la localización indicada de proteínas de fusión representativas. (De W.-K. Huh, J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissman y E. K. O'Shea, 2003. *Nature* 425:686. Imágenes cortesía de James Falvo.)

drias, por ejemplo, se estima que contienen unas 1.000 proteínas diferentes, más de 600 de las cuales han sido identificadas mediante espectrometría de masas de mitocondrias aisladas. Un análisis similar del proteoma de una variedad de orgánulos subcelulares es actualmente uno de los esfuerzos investigadores principales en diversos laboratorios y se espera que proporcione una base de datos de constituyentes proteicos de estos compartimentos de las células eucariotas.

Una técnica alternativa se ha aplicado recientemente al análisis sistemático de la localización de proteínas en levaduras. En estos experimentos, los investigadores han construido una colección de cepas de levaduras en las que cada proteína codificada por el genoma de la levadura fue expresada como una proteína de fusión con la proteína verde fluorescente (GFP: *green fluorescent protein*), permitiendo determinar la localización subcelular de la proteína marcada con GFP mediante microscopia de fluorescencia (véase Fig. 1.27). Mediante esta técnica, las localizaciones subcelulares de más de 4.000 proteínas fue determinada (Fig. 2.32). Esto representa el 75% del número total de proteínas de levaduras, incluyendo muchas proteínas cuya localización subcelular era previamente desconocida, de modo que este análisis global de localización de proteínas en levaduras proporciona un catálogo completo de la localización proteica en un modelo de célula eucariota.

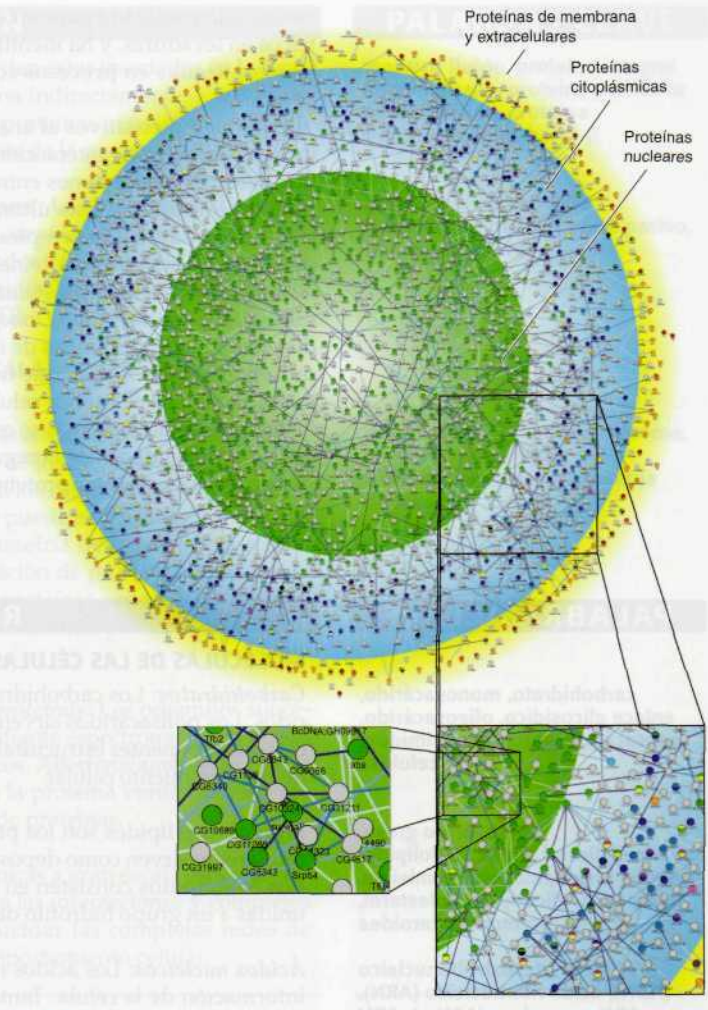


Figura 2.33 Un mapa de interacciones proteicas de *Drosophila melanogaster*. Se muestran interacciones entre 2.346 proteínas, con cada proteína representada como un círculo situado de acuerdo con su localización subcelular. (De L. Glot y cols. 2003. *Science* 302: 1727).

Interacciones proteicas

Las proteínas casi nunca actúan solas en el interior de la célula. Al contrario, generalmente funcionan mediante su interacción con otras proteínas pertenecientes a complejos y redes proteicos. Discernir las interacciones entre proteínas, por tanto, proporciona pistas importantes sobre la función de proteínas nuevas, además de facilitar la comprensión de las complejas redes de interacciones proteicas que gobiernan el comportamiento celular. Junto con estudios de localización subcelular global, el análisis sistemático de los complejos proteicos y sus interacciones se ha convertido en un objetivo muy importante de la proteómica.

Un enfoque de análisis de complejos proteicos es aislar una proteína a partir de células bajo condiciones suaves, de modo que permanece asociada con las proteínas con las que normalmente interacciona en el interior de la célula. Los complejos proteicos aislados pueden entonces analizarse mediante espectrometría de masas para identificar todas las proteínas presentes en el complejo. Este enfoque al análisis de interacciones protei-

cas ha sido empleado para investigaciones a gran escala de complejos proteicos en levaduras, y ha identificado numerosas interacciones entre proteínas implicadas en procesos como la señalización celular o la expresión génica.

Enfoques alternativos al análisis sistemático de los complejos proteicos incluyen ensayos de interacciones proteicas *in vitro* y los ensayos genéticos que detectan interacciones entre parejas de proteínas que se introducen en células de levaduras. Esta última técnica (denominada método de doble híbrido en levaduras) fue empleado inicialmente para estudios a gran escala de interacciones entre proteínas de levaduras, pero más recientemente ha sido aplicada al estudio sistemático de interacciones entre proteínas de eucariotas superiores, como *Drosophila, C. elegans* y el ser humano. Estos estudios han identificado miles de interacciones proteína-proteína, que pueden presentase como mapas que muestran una extensa red de proteínas que interaccionan en el interior celular (Fig. 2.33). El discernimiento continuado de estas redes de proteínas se espera que extienda nuestra comprensión sobre las complejidades de la regulación celular, además de iluminar las funciones de muchas de las proteínas todavía sin identificar.

PALABRAS CLAVE

carbohidrato, monosacárido, enlace glicosídico, oligosacárido, polisacárido, glucógeno, almidón, celulosa

lípido, ácido graso, triacilglicerol, grasa, fosfolípido, glicerol fosfolípido, esfingomielina, anfipático, glicolípido, colesterol, hormona esteroidea

ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico, ARN de transferencia, nucleótido, purina, pirimidina, adenina, guanina, citosina, timina, uracilo, 2'-desoxirribosa, ribosa, nucleósido, enlace fosfodiéster, oligonucleótido, polinucleótido

proteína, aminoácido, enlace peptídico, polipéptido, cristalografía de rayos X, estructura primaria, estructura secundaria, α-hélice, hoja β, estructura terciaria, dominio, estructura cuaternaria

bicapa de fosfolípidos

RESUMEN

MOLÉCULAS DE LAS CÉLULAS

Carbohidratos: Los carbohidratos incluyen azúcares simples y polisacáridos. Los polisacáridos sirven como formas de almacenamiento de azúcares, componentes estructurales de las células y marcadores en procesos de reconocimiento celular.

Lípidos: Los lípidos son los principales componentes de las membranas celulares, y sirven como depósito de energía y moléculas de señalización. Los fosfolípidos consisten en dos cadenas de ácidos grasos hidrófobos unidas a un grupo hidrófilo de cabeza que contiene fosfato.

Ácidos nucleicos: Los ácidos nucleicos son las principales moléculas de información de la célula. Tanto el ADN como el ARN son polímeros de nucleótidos de purina y pirimidina. Los enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias permiten a los ácidos nucleicos dirigir su propia replicación.

Proteínas: Las proteínas son polímeros de 20 aminoácidos distintos, cada uno de los cuales tiene una cadena lateral distinta con propiedades químicas específicas. Cada proteína tiene una secuencia de aminoácidos propia, que determina su estructura tridimensional. En la mayoría de las proteínas, combinaciones de α-hélices y hojas β se pliegan en dominios globulares con aminoácidos hidrófobos en el interior y aminoácidos hidrófilos en la superficie.

MEMBRANAS CELULARES

Lípidos de membrana: La estructura básica de todas las membranas celulares es una bicapa de fosfolípidos. Las membranas de células animales también contienen glucolípidos y colesterol.

RESUMEN

Proteínas de membrana: Las proteínas pueden estar insertadas en la bicapa lipídica o bien asociadas a la membrana indirectamente, a través de interacciones proteína-proteína. Algunas proteínas atraviesan la bicapa lipídica; otras están ancladas a una vertiente de la membrana.

Transporte a través de membranas celulares: Las bicapas lipídicas son permeables sólo a moléculas pequeñas no cargadas. Los iones y la mayoría de las moléculas polares son transportados a través de las membranas celulares por proteínas de transporte específicas, cuya actuación puede ser acoplada a la hidrólisis o síntesis de ATP.

PROTEÓMICA: EL ANÁLISIS A GRAN ESCALA DE LAS PROTEÍNAS CELULARES

Identificación de proteínas celulares: La caracterización del complemento proteico completo de las células es uno de los objetivos principales de la proteómica. Un método establecido para los estudios de proteómica es la electroforesis en gel bidimensional, que puede emplearse para separar miles de proteínas celulares. La espectrometría de masas proporciona una herramienta potente para la identificación de proteínas, lo que puede emplearse para analizar muestras de proteínas separadas mediante electroforesis en gel bidimensional o para identificar proteínas a partir de extractos celulares sin fraccionar.

Análisis global de la localización de las proteínas: Los orgánulos subcelulares aislados pueden ser analizados mediante espectrometría de masas para determinar sus constituyentes proteicos. Alternativamente, se puede marcar un gran número de proteínas con la proteína verde fluorescente para los estudios globales de localización de proteínas.

Interacción proteica: Una variedad de técnicas a gran escala están siendo aplicadas a la identificación sistemática de las interacciones y complejos proteína-proteína con el objetivo de dilucidar las complejas redes de interacciones proteicas que regulan el comportamiento celular.

PALABRAS CLAVE

mosaico fluido, proteína integral de membrana, proteína periférica de membrana, proteína transmembrana, barril-β

canal proteico, proteína transportadora, transporte pasivo, transporte activo

genómica, proteómica, proteoma, electroforesis en gel bidimensional, espectrometría de masas

Preguntas

1. ¿Qué características del agua contribuyen a su función como la molécula más abundante de las células?

2. A pesar de que el glucógeno y la celulosa están compuestos por monómeros de glucosa, son químicamente distintos. ¿En qué sentido?

3. Cuáles son las principales funciones de las grasas y los fosfolípidos en las células?

4. Además de servir como bloques de construcción para los ácidos nucleicos, ¿qué otras funciones importantes poseen los nucleótidos en las células?

5. Si eliminas todas las bases de una molécula de ARNm, ¿podría seguir funcionando como molécula transporadora de información?

6. ¿Cuál era la evidencia experimental que demostró que la información necesaria para el plegamiento de proteínas está contenida en la secuencia de sus aminoácidos?

7. ¿Cómo facilita la cadena lateral de la cisteína el plegamiento de algunas proteínas?

8. ¿Cuáles son los papeles biológicos del colesterol?

9. ¿Por qué son las regiones que atraviesan la membrana de las proteínas transmembrana frecuentemente α-hélices? ¿Qué otra estructura proteica es capaz de atravesar membranas?

10. ¿Cuál de los siguientes aminoácidos es más probable encontrarse en una α-hélice transmembrana?
   a) Lisina
   b) Glutamina
   c) Ácido aspártico
   d) Alanina
   e) Arginina

11. ¿Qué propiedades de las proteínas son las aprovechadas para la separación de proteínas individuales a partir de una mezcla compleja mediante electroforesis en gel bidimensional?

12. Haz una lista y explica brevemente las técnicas de proteómica a gran escala para determinar la localización subcelular de las proteínas.

Bibliografía

Moléculas de las células

Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223–230. [P]

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer. 2002. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W. H. Freeman.

Branden, C. and J. Tooze. 1999. *Introduction to Protein Structure*. 2nd ed. New York: Garland.

Kendrew, J. C. 1961. The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* 205(6): 96–111. [R]

Mathews, C. K., K. E. van Holde and K. G. Ahern. 2000. *Biochemistry*. 3rd ed. Redwood City, CA: Benjamin Cummings.

Nelson, D. L. and M. M. Cox. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York: W. H. Freeman.

Pauling, L., R. B. Corey, and H. R. Branson. 1951. The structure of proteins: Two hydrogen bonded configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37: 205–211. [P]

Petsko, G. A. and D. Ringe. 2003. *Protein Structure and Function*. Sunderland, MA: Sinauer.

Sanger, F. 1988. Sequences, sequences, and sequences. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 1–28. [R]

Tanford, C. 1978. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200: 1012–1018. [R]

Membranas celulares

Bretscher, M. 1985. The molecules of the cell membrane. *Sci. Am.* 253(4): 100–108. [R]

Dowham, W. 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Ann. Rev. Biochem.* 66: 199–212. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121–138. [R]

Farazi, T. A., G. Waksman and J. I. Gordon. 2001. The biology and enzymology of protein *N*-myristoylation. *Ann. Rev. Biochem.* 276: 39501–39504. [R]

Lacapere, J.-J., E. Pebay-Peyroula, J.-M. Neumann and C. Etchebest. 2007. Determining membrane protein structures: still a challenge! *Trends Biochem. Sci.* 32: 259–270. [R],

Petty, H. R. 1993. *Molecular Biology of Membranes: Structure and Function*. New York: Plenum Press.

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247–296. [R]

Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720–731. [P]

Tamm, L. K., A. Arora and J. H. Kleinschmidt. 2001. Structure and assembly of β-barrel membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 32399–32402. [R]

Towler, D. A., J. I. Gordon, S. P. Adams and L. Glaser. 1988. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 69–99. [R]

White, S. H., A. S. Ladokhin, S. Jayasinghe and K. Hristova. 2001. How membranes shape protein structure. *J. Biol. Chem.* 276: 32395–32398. [R]

Zhang, F. L. and P. J. Casey. 1996. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 241–269. [R]

Proteómica: el análisis a gran escala de las proteínas celulares

Brunet, S., P. Thibault, E. Gagnon, P. Kearney, J. J. M. Bergeron and M. Desjardins. 2003. Organelle proteomics: Looking at less to see more. *Trends Cell Biol.* 13: 629–638. [R]

De Hoog, C. L. and M. Mann. 2004. Proteomics. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 5: 267–293. [R]

Domon, B. and R. Aebersold. 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312: 212–217. [R]

Gavin, A.-C. and 37 others. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415: 141–147. [P]

Gingras, A.-C., M. Gstaiger, B. Raught and R. Aebersold. 2007. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 645–654. [R]

Giot, L. and 48 others. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302: 1727–1736. [P]

Huh, W.-K., J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissman and E. K. O'Shea. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425: 686–691. [P]

Krogan, N. J. and 52 others. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440: 637–643. [P]

Li, S. and 47 others. 2004. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 303: 540–543. [P]

Resing, K. A. and N. G. Ahn. 2005. Proteomics strategies for protein identification. *FEBS Lett.* 579: 885–889. [R]

Steen, H. and M. Mann. 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 699–711. [R]

Zhu, H., M. Bilgin and M. Snyder. 2003. Proteomics. *Ann. Rev. Biochem.* 72: 783–812. [R]

CAPÍTULO 3

Metabolismo celular

Las enzimas son unos catalizadores increíbles. Algunas enzimas son capaces de incrementar la tasa de una reacción tanto como 10^{18} veces en comparación con una reacción sin catalizar, de modo que un proceso que normalmente tardaría billones de años puede tener lugar en menos de un segundo.

LAS CÉLULAS LLEVAN A CABO UNA GRAN VARIEDAD de reacciones químicas, responsables tanto de la degradación de moléculas que sirven como alimento, como de la síntesis de los constituyentes celulares. Este capítulo presenta *una visión general de esta compleja red de reacciones químicas,* que constituyen el metabolismo de la célula. No pretende ser una revisión en detalle *de la bioquímica ni describir todas las reacciones metabólicas que tienen lugar en el interior celular.* Al contrario, este capítulo se centra en tres temas principales: el papel de las proteínas como catalizadores biológicos, la generación y utilización de la energía metabólica, y la biosíntesis de los principales constituyentes celulares. Una apreciación de estos aspectos clave es básica para la comprensión de los diversos aspectos de la estructura y función celular que se revisará a lo largo del resto del texto.

Papel central de las enzimas como catalizadores biológicos

Una tarea fundamental de las proteínas es actuar como enzimas —catalizadores que incrementan la velocidad de prácticamente todas las reacciones químicas dentro de la célula—. Aunque los ARN son capaces de catalizar algunas reacciones, la mayoría de las reacciones biológicas son catalizadas por proteínas. En ausencia de catálisis enzimática, la mayoría de las reacciones bioquímicas son tan lentas que no ocurrirían en condiciones de temperatura y presión compatibles con la vida. Las enzimas aceleran la velocidad de estas reacciones muy por encima de un millón de veces, de tal forma que reacciones que tardarían años en la ausencia de catálisis pueden ocurrir en fracciones de segundos si son catalizadas por la enzima adecuada. Las células contienen miles de enzimas diferentes, y su actividad determina cuáles de las múltiples reacciones químicas posibles tienen lugar en la práctica dentro de la célula.

Actividad catalizadora de las enzimas

Como todos los demás catalizadores, las **enzimas** se caracterizan por dos propiedades fundamentales. En primer lugar, aumentan la velocidad de las reacciones químicas sin ser consumidas o alteradas permanentemente por la reacción. En segundo lugar, aumentan la velocidad de las reacciones sin alterar el equilibrio químico entre sustratos y productos.

Estos principios de catálisis enzimática se ilustran en el siguiente ejemplo, en el que una molécula sobre la que actúa un enzima (denominada **sustrato** [S]) se convierte en un **producto** (*P*) como resultado de la reacción. En ausencia de enzima, la reacción puede escribirse como sigue:

$$S \rightleftharpoons P$$

El equilibrio químico entre *S* y *P* depende de las leyes de la termodinámica (como se trata más adelante en la siguiente sección de este capítulo) y se representa como la razón de las velocidades de las reacciones directa e inversa ($S \rightarrow P$ y $P \rightarrow S$, respectivamente). En presencia de la enzima apropiada, la conversión de *S* a *P* se acelera, pero el equilibrio entre *S* y *P* no se altera. Por lo tanto, la enzima debería acelerar las reacciones directa e inversa igualmente. La reacción puede escribirse como sigue:

$$S \overset{E}{\rightleftharpoons} P$$

Obsérvese que la enzima (*E*) no se altera por la reacción, así que el equilibrio químico se mantiene inalterado, determinado tan sólo por las propiedades termodinámicas de *S* y *P*.

3.1 Animación web

Catalizadores y activación de la energía

En una reacción química, una enzima disminuye la cantidad de energía necesaria para alcanzar el estado de transición, permitiendo que la reacción tenga lugar a una velocidad acelerada.

El efecto de la enzima en una reacción como esta se ilustra mejor por los cambios energéticos que deben ocurrir durante la conversión de *S* a *P* (Fig. 3.1). El equilibrio de la reacción viene determinado por el estado energético final de S y P, que no están afectados por la catálisis enzimática. Para que la reacción enzimática pueda producirse, sin embargo, el sustrato debe convertirse primero a un estado de mayor energía, denominado **estado de transición**. La energía necesaria para alcanzar el estado de transición (la **energía de activación**) constituye una barrera para el desarrollo de la reacción, limitando la velocidad de la reacción. Las enzimas (y otros catalizadores) actúan reduciendo la energía de activación, incrementando de este modo la velocidad de la reacción. El incremento de velocidad es el mismo, tanto en la dirección directa como en la inversa, ya que ambas deben pasar por el mismo estado de transición.

La actividad catalítica de las enzimas implica su unión a los sustratos para formar un complejo enzima-sustrato (*ES*). El sustrato se une a una región específica de la enzima, denominada **lugar activo**. Mientras está ligado al lugar activo, el sustrato se convierte en el producto de la reacción, que entonces se separa de la enzima. La reacción catalizada por enzimas puede por tanto escribirse como sigue:

$$S + E \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$$



Figura 3.1 Diagramas energéticos para reacciones catalizadas y no catalizadas. La reacción ilustrada es la conversión simple de un sustrato *S* a un producto *P*. Debido a que el estado final de energía de *P* es menor que el de *S*, la reacción progresa de izquierda a derecha. Para que la reacción tenga lugar, sin embargo, *S* debe pasar primero por un estado de transición de mayor energía. La energía requerida para alcanzar este estado de transición (la energía de activación) representa una barrera al desarrollo de la reacción y por tanto determina la velocidad a la que la reacción avanza. En presencia de un catalizador (p. ej., una enzima), la energía de activación disminuye y la reacción se produce a una velocidad acelerada.

Obsérvese que *E* aparece inalterada en ambos lados de la ecuación, así que el equilibrio no se afecta. Sin embargo, la enzima proporciona una superficie sobre la que las reacciones que convierten *S* en *P* pueden tener lugar más fácilmente. Esto es el resultado de las interacciones entre la enzima y sustrato que disminuyen la energía de activación y favorecen la formación del estado de transición.

Mecanismos de catálisis enzimática

La unión del sustrato al sitio activo de una enzima es una interacción muy específica. Los lugares activos son grietas o hendiduras en la superficie de una enzima, habitualmente compuestas de aminoácidos de diferentes partes de la cadena polipeptídica que se aproximan con la estructura terciaria de la proteína plegada. Los sustratos se ligan inicialmente al lugar activo mediante interacciones no covalentes, incluyendo enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrófobas. Una vez que el sustrato está unido al lugar activo de una enzima, múltiples mecanismos pueden acelerar su conversión en el producto de la reacción.

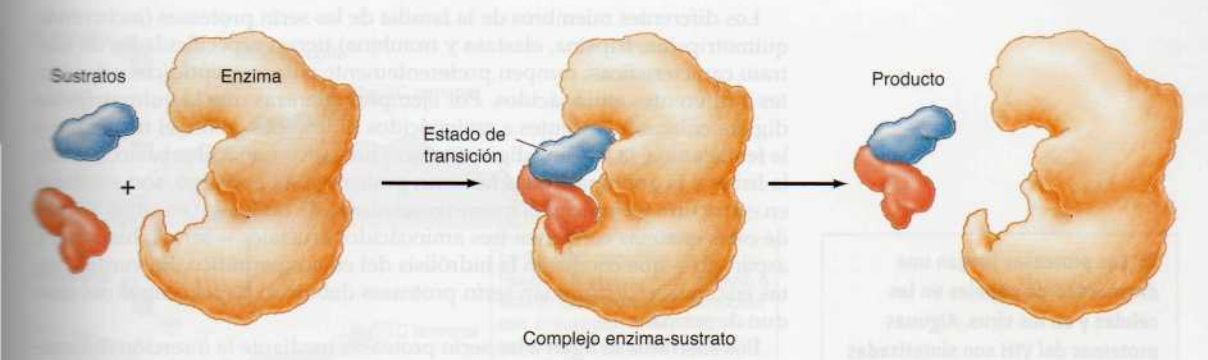


Figura 3.2 Catálisis enzimática de una reacción entre dos sustratos. La enzima proporciona un molde sobre el que los reactantes se aproximan en la posición y orientación adecuada para reaccionar entre sí.

Aunque este sencillo ejemplo tratado en la sección anterior implicaba una única molécula de sustrato, la mayoría de las reacciones bioquímicas implican interacciones entre dos o más sustratos diferentes. Por ejemplo, la formación de un enlace peptídico implica la unión de dos aminoácidos. Para reacciones como esta, la unión de dos o más sustratos al lugar activo en la posición y orientación adecuada acelera la reacción (Fig. 3.2). La enzima proporciona un molde sobre el que los reactantes se aproximan y se orientan correctamente para favorecer la formación del estado de transición en el que interactúan.

Las enzimas también aceleran las reacciones alterando la conformación de sus sustratos para acercarse al del estado de transición. El modelo más sencillo de interacción enzima-sustrato es el **modelo de la llave y la cerradura**, en el que el sustrato encaja perfectamente en el sitio activo (Fig. 3.3A). En muchos casos, sin embargo, las configuraciones tanto de la enzima como del sustrato son modificadas por la unión del sustrato —un proceso denominado **ajuste inducido** (Fig. 3.3B)—. En estos casos la conformación del sustrato se altera de tal forma que se asemeja más a la del estado de transición. El estrés producido por esta distorsión en el sustrato puede facilitar aún más su conversión hasta alcanzar el estado de transición debilitando enlaces cruciales. Además, el estado de transición se estabiliza por su estrecha unión a la enzima, disminuyendo de este modo la energía de activación requerida.

Aparte de reunir múltiples sustratos y distorsionar la conformación de los sustratos para aproximarlos al estado de transición, muchas enzimas participan directamente en el proceso catalítico. En estos casos, las cadenas laterales específicas de aminoácidos en el sitio activo pueden reaccionar con el sustrato y formar enlaces con intermediarios de la reacción. Los aminoácidos ácidos y básicos están frecuentemente implicados en estos mecanismos catalíticos, como se demuestra en la siguiente discusión sobre la quimotripsina como un ejemplo de catálisis enzimática.

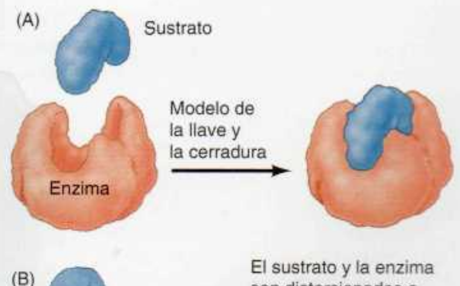
La quimotripsina es miembro de una familia de enzimas (las serín proteasas) que digieren las proteínas catalizando la hidrólisis de los enlaces peptídicos. La reacción puede escribirse como sigue:

$$\text{Proteína} + H_2O \rightarrow \text{Péptido}_1 + \text{Péptido}_2$$

3.2 Animación web

Reacciones catalizadas por enzimas

En este ejemplo, una enzima proporciona un molde sobre el que dos sustratos entran en contacto en la posición y orientación adecuada para poder reaccionar entre sí.



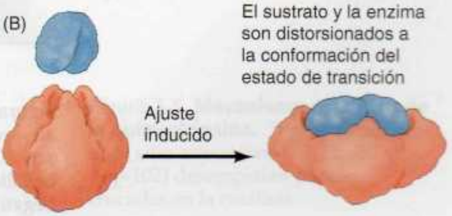


Figura 3.3 Modelos de la interacción enzima-sustrato. (A) En el modelo de la llave y la cerradura, el sustrato encaja perfectamente en el sitio activo de la enzima. (B) En el modelo de ajuste inducido, la unión del sustrato distorsiona las conformaciones tanto de la enzima como del sustrato. Esta distorsión aproxima al sustrato a la conformación del estado de transición, acelerando de este modo la reacción.

■ ***Las proteasas** juegan una* **diversisdad de papeles en las células y en los virus. Algunas proteínas del VIH son sintetizadas como precursores que requieren su escisión por una proteasa viral para hacer partículas virales infecciosas. La inhibición de la** ***proteasa bloquea la replicación del*** **VIH, y actualmente se emplean medicamentos diseñados para inhibir la proteasa para el tratamiento del SIDA.**

Los diferentes miembros de la familia de las serín proteasas (incluyendo quimotripsina, tripsina, elastasa y trombina) tienen especificidades de sustrato características; rompen preferentemente enlaces peptídicos adyacentes a diferentes aminoácidos. Por ejemplo, mientras que la quimotripsina digiere enlaces adyacentes a aminoácidos hidrófobos, como el triptófano y la fenilalanina, la tripsina digiere enlaces junto a aminoácidos básicos, como la lisina y la arginina. Todas las serín proteasas, sin embargo, son similares en estructura y emplean el mismo mecanismo de catálisis. Los sitios activos de estas enzimas contienen tres aminoácidos cruciales —serina, histidina y aspartato— que conducen la hidrólisis del enlace peptídico. En verdad, estas enzimas se denominan serín proteasas debido al papel central del residuo de serina.

Los sustratos se ligan a las serín proteasas mediante la inserción del aminoácido adyacente al sitio de corte en un bolsillo en el lugar activo de la enzima (Fig. 3.4). La naturaleza de este bolsillo determina la especificidad de sustrato de los diferentes miembros de la familia de las serín proteasas. Por ejemplo, el bolsillo de unión de la quimotripsina contiene aminoácidos hidrófobos que interaccionan con las cadenas laterales hidrofóbicas de sus sustratos preferidos. En contraste, el bolsillo de unión de la tripsina contiene un aminoácido cargado negativamente (aspartato), que es capaz de formar un enlace iónico con residuos de arginina o de lisina de sus sustratos.

*La unión del sustrato sitúa al enlace peptídico para ser desdoblado cer*cano a la serina del lugar activo (Fig. 3.5). El protón de esta serina entonces se transfiere a la histidina del lugar activo. La conformación del lugar activo favorece esta transferencia de protones porque la histidina interacciona con el residuo de aspartato cargado negativamente. La serina reacciona con el sustrato, formando un intermediario o estado de transición tetrahédrico. El enlace peptídico entonces se desdobla, y la porción C-terminal del sustrato *se libera de la enzima. Sin embargo, el péptido N-terminal permanece uni*do a la serina. Esta situación se resuelve cuando una molécula de agua (el segundo sustrato) entra en el sitio activo y revierte las reacciones precedentes. El protón de la molécula de agua se transfiere a la histidina, y su grupo hidroxilo al péptido, formando un segundo estado de transición tetrahédrico. El protón se transfiere entonces de la histidina de vuelta a la serina, y el péptido se libera de la enzima, completando la reacción.

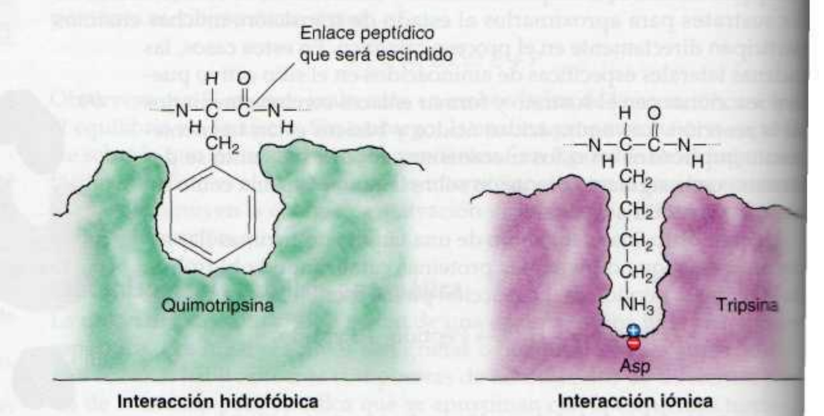


Figura 3.4 Ligamiento del sustrato por las serín proteasas. El aminoácido adyacente al enlace peptídico que será roto se inserta en un «bolsillo» en el sitio activo de la enzima. En la quimotripsina, el bolsillo liga aminoácidos hidrófobos; el bolsillo de unión de la tripsina contiene un residuo de aspartato cargado negativamente que liga aminoácidos básicos mediante una interacción iónica.

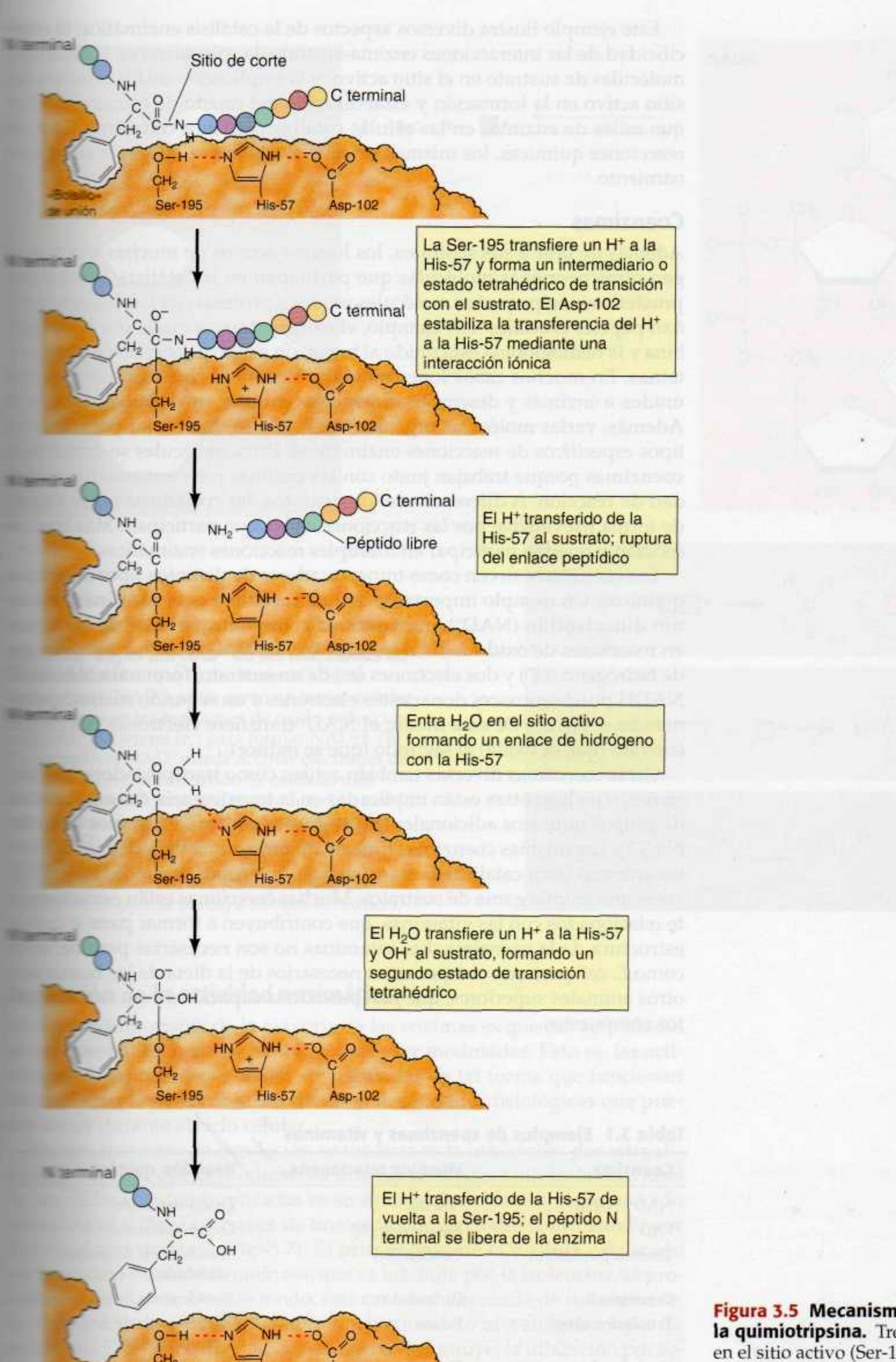


Figura 3.5 Mecanismo catalítico de la quimiotripsina. Tres aminoácidos en el sitio activo (Ser-195, His-57 y Asp-102) desempeñan papeles cruciales en la catálisis.

Este ejemplo ilustra diversos aspectos de la catálisis enzimática; la especificidad de las interacciones enzima-sustrato, la colocación de las distintas moléculas de sustrato en el sitio activo, y la implicación de los residuos del sitio activo en la formación y estabilización del estado de transición. Aunque miles de enzimas en las células catalizan muchos diferentes tipos de reacciones químicas, los mismos principios básicos se aplican a su funcionamiento.

Coenzimas

Además de unir a sus sustratos, los lugares activos de muchas enzimas ligan otras pequeñas moléculas que participan en la catálisis. Los **grupos prostéticos** son pequeñas moléculas unidas a proteínas en las que desempeñan papeles cruciales. Por ejemplo, el oxígeno transportado por la mioglobina y la hemoglobina está unido al hemo, un grupo prostético de estas proteínas. En muchos casos iones metálicos (como el cinc o el hierro) están unidos a enzimas y desempeñan papeles centrales en el proceso catalítico. Además, varias moléculas orgánicas de bajo peso molecular participan en tipos específicos de reacciones enzimáticas. Estas moléculas se denominan **coenzimas** porque trabajan junto con las enzimas para aumentar la velocidad de reacción. A diferencia de los sustratos, las coenzimas no se alteran de forma irreversible por las reacciones en las que participan. Más bien, se reciclan y pueden participar en múltiples reacciones enzimáticas.

Las coenzimas sirven como transportadores de distintos tipos de grupos químicos. Un ejemplo importante de una coenzima es el **nicotinamín adenín dinucleótido (NAD^+)**, que funciona como transportador de electrones en reacciones de óxido-reducción (Fig. 3.6). El NAD^+ puede aceptar un ión de hidrógeno (H^+) y dos electrones (e^-) de un sustrato, formando NADH. El NADH puede entonces donar estos electrones a un segundo sustrato, reformando el NAD^+. De este modo, el NAD^+ transfiere electrones del primer sustrato (que se oxida) al segundo (que se reduce).

Otras coenzimas diversas también actúan como transportadores de electrones, e incluso otras están implicadas en la transferencia de una variedad de grupos químicos adicionales (p. ej., grupos carboxilo y grupos acilo; Tabla 3.1). Las mismas coenzimas funcionan junto a una variedad de diferentes enzimas para catalizar la transferencia de grupos químicos específicos entre una amplia gama de sustratos. Muchas coenzimas están estrechamente relacionados con las vitaminas, que contribuyen a formar parte o toda la estructura de la coenzima. Las vitaminas no son necesarias para bacterias como *E. coli* pero son componentes necesarios de la dieta de los humanos y otros animales superiores, que han perdido la capacidad para sintetizar estos compuestos.

Tabla 3.1 Ejemplos de coenzimas y vitaminas

Coenzima	Vitamina relacionada	Reacción química
NAD^+, $NADP^+$	Niacina	Óxido-reducción
FAD	Riboflavina (B_2)	Óxido-reducción
Tiamina pirofosfato	Tiamina (B_1)	Transferencia de grupos aldehído
Coenzima A	Pantoténico	Transferencia de grupos acilo
Tetrahidrofolato	Folato	Transferencia de grupos de un carbono
Biotina	Biotina	Carboxilación
Piridoxal fosfato	Piridoxal (B_6)	Transaminación

(B)

1
$$\text{H-C-OH (S1}_{(red)}) + NAD^+ \longrightarrow \text{HC=O (S1}_{(ox)}) + NADH + H^+$$

2
$$\text{HC=O (S2}_{(ox)}) + NADH + H^+ \longrightarrow \text{H-C-OH (S2}_{(red)}) + NAD^+$$

Sum:
$$\text{H-C-OH (S1}_{(red)}) + \text{HC=O (S2}_{(ox)}) \longrightarrow \text{HC=O (S1}_{(ox)}) + \text{H-C-OH (S2}_{(red)})$$

Figura 3.6 Papel del NAD+ en las reacciones de óxido-reducción. (A) El nicotinamín adenín dinucleótido (NAD^+) actúa como un transportador de electrones en las reacciones de óxido-reducción aceptando electrones (e^-) para formar NADH. (B) Por ejemplo, el NAD^+ puede aceptar electrones de un sustrato (S1), produciendo S1 oxidado más NADH. El NADH formado en esta reacción puede entonces transferir sus electrones a un segundo sustrato (S2), produciendo S2 reducido y regenerando NAD^+. El efecto neto es la transferencia de electrones (transportados por NADH) de S1 (que se oxida) a S2 (que se reduce).

Regulación de la actividad enzimática

Un aspecto importante de la mayoría de las enzimas es que sus actividades no son constantes, pero en cambio pueden ser moduladas. Esto es, las actividades de las enzimas pueden ser reguladas de tal forma que funcionan adecuadamente para cubrir las diversas necesidades fisiológicas que pueden surgir durante el ciclo celular.

Un tipo frecuente de regulación enzimática es la **inhibición por retroalimentación**, en la que el producto de una vía metabólica inhibe la actividad de una de las enzimas implicadas en su síntesis. Por ejemplo, el aminoácido isoleucina se sintetiza a través de una serie de reacciones comenzando por el aminoácido treonina (Fig. 3.7). El primer paso de la vía está catalizado por la enzima treonina deaminasa, que es inhibida por la isoleucina, el producto final de la vía. De este modo, una cantidad adecuada de isoleucina en la célula inhibe la treonina desaminasa, bloqueando una síntesis mayor de isoleucina. Si la concentración de isoleucina disminuye, la inhibición por retroalimentación disminuye, la treonina desaminasa ya no se inhibe, y se sintetiza isoleucina adicional. Regulando de este modo la actividad de la treo-

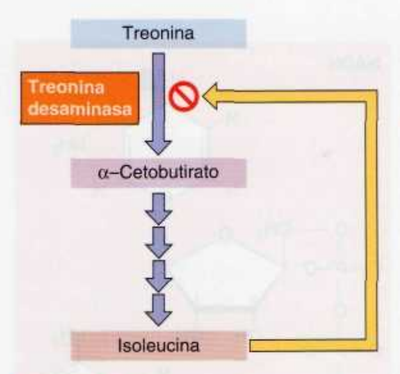


Figura 3.7 Inhibición por retroalimentación. El primer paso en la conversión de treonina a isoleucina es catalizado por la enzima treonina desaminasa. La actividad de esta enzima está inhibida por la isoleucina, el producto final de la vía.

nina desaminasa, la célula sintetiza la cantidad necesaria de isoleucina pero evita desperdiciar energía en la síntesis de más isoleucina de la necesaria.

La inhibición por retroalimentación es un ejemplo de la **regulación alostérica**, en la que la actividad enzimática se controla por la unión de moléculas pequeñas a los lugares reguladores de la enzima (Fig. 3.8). El término «regulación alostérica» deriva del hecho de que las moléculas reguladoras no se unen al sitio catalítico, sino a un sitio específico en la proteína (*allo* = «otro» y *steric* = «sitio»). La unión de la molécula reguladora cambia la conformación de la proteína, lo que a su vez altera la forma del sitio activo y la actividad catalítica de la enzima. En el caso de la treonina desaminasa, el ligamiento de la molécula reguladora (isoleucina) inhibe la actividad enzimática. En otros casos las moléculas reguladoras actúan como activadores, estimulando en vez de inhibir sus enzimas diana.

Las actividades de las enzimas también pueden ser reguladas por sus interacciones con otras proteínas y por modificaciones covalentes, como la adición de grupos fosfato a residuos de serina, treonina o tirosina. La **fosforilación** es un mecanismo especialmente frecuente para regular la actividad enzimática; la adición de grupos fosfato puede estimular o inhibir las actividades de muchas enzimas diferentes (Fig. 3.9). Por ejemplo, las células musculares responden a la epinefrina (adrenalina) degradando el glucógeno a glucosa, proporcionando de este modo una fuente de energía para una actividad muscular aumentada. La degradación del glucógeno es catalizada por la enzima glucógeno fosforilasa, que se activa por la fosforilación en respuesta a la unión de la epinefrina a un receptor en la superficie de la célula muscular. La fosforilación de proteínas desempeña un papel central en el control no sólo de las reacciones metabólicas sino también de muchas otras funciones celulares, incluyendo el crecimiento y diferenciación celular.

Energía metabólica

Muchas tareas que debe realizar una célula, como el movimiento y la síntesis de macromoléculas, requieren de energía. Una gran parte de las actividades de la célula están por tanto dedicadas a obtener energía del entorno y a emplear esa energía para activar reacciones que la necesitan. Aunque las enzimas controlan la velocidad de prácticamente todas las reacciones quí-

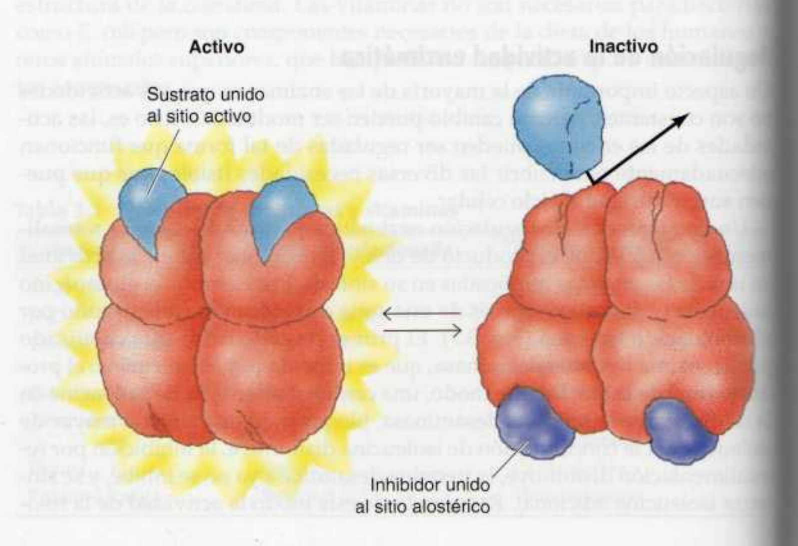
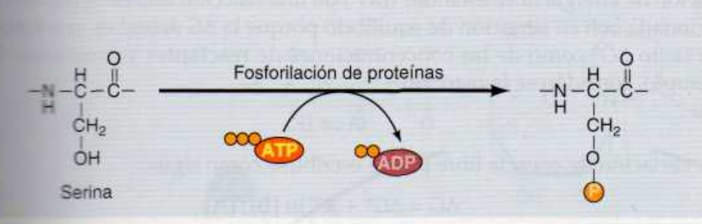


Figura 3.8 Regulación alostérica. En este ejemplo, la actividad enzimática es inhibida por la unión de una molécula reguladora a un sitio alostérico. En ausencia del inhibidor, el sustrato se une al sitio activo de la enzima y la reacción progresa. La unión del inhibidor al sitio alostérico induce un cambio conformacional en la enzima e impide la unión del sustrato. La mayoría de las enzimas alostéricas constan de múltiples subunidades.



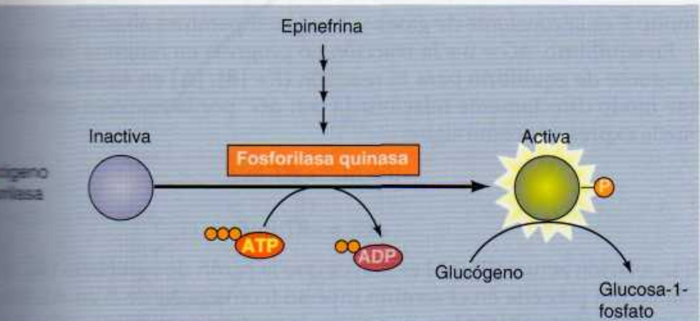


Figura 3.9 Fosforilación de proteínas. Algunas enzimas están reguladas por la adición de grupos fosfato a los grupos OH de las cadenas laterales de residuos de serina (como se muestra aquí), treonina o tirosina. Por ejemplo, la enzima glucógeno fosforilasa, que cataliza la conversión del glucógeno a glucosa-1-fosfato, es activada por fosforilación en respuesta a la unión de epinefrina a las células musculares.

micas dentro de las células, la situación de equilibrio de las reacciones químicas no está afectada por la catálisis enzimática. Las leyes de la termodinámica gobiernan el equilibrio químico y determinan la dirección energéticamente favorable en todas las reacciones químicas. Muchas de las reacciones que deben tener lugar dentro de las células son energéticamente desfavorables, y por tanto sólo pueden producirse con un ingreso adicional de energía. En consecuencia, las células deben gastar constantemente energía derivada del entorno. La generación y utilización de energía metabólica es por tanto fundamental en toda la biología celular.

Energía libre y ATP

La energética de las reacciones bioquímicas se describe mejor en términos de la función termodinámica denominada **energía libre de Gibbs (*G*)**, así llamada por Josiah Willard Gibbs. La variación en la energía libre (ΔG) de una reacción combina los efectos de cambios en la entalpía (el calor que se libera o es absorbido durante una reacción química) y la entropía (el grado de desorden que resulta de una reacción) para predecir si una reacción es o no energéticamente favorable. Todas las reacciones químicas progresan espontáneamente en la dirección energéticamente favorable, acompañadas por un descenso en la energía libre ($\Delta G < 0$). Por ejemplo, considérese una hipotética reacción en la que A se convierte en B:

$$A \rightleftharpoons B$$

Si $\Delta G < 0$, esta reacción progresará en la dirección directa, como se ha escrito. Si $\Delta G > 0$, sin embargo, la reacción progresará en la dirección inversa y B se convertirá en A.

La ΔG de una reacción viene determinada no sólo por las propiedades intrínsecas de los reactantes y los productos, sino también por sus concentraciones y otras condiciones de la reacción (p. ej., la temperatura). De este modo, es útil definir la variación de energía libre de una reacción en condiciones estándar. (Las condiciones estándar se considera que son 1 *M* de concentración de todos los reactantes y productos y 1 atm de presión). La va-

riación de energía libre estándar ($\Delta G°$) de una reacción está directamente relacionada con su situación de equilibrio porque la ΔG actual es una función de tanto $\Delta G°$ como de las concentraciones de reactantes y productos. Por ejemplo, considérese la reacción

$$A \rightleftharpoons B$$

La variación de energía libre puede escribirse como sigue:

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln [B]/[A]$$

donde R es la constante de gases y T es la temperatura absoluta.

En equilibrio, $\Delta G = 0$ y la reacción no progresa en ninguna dirección. La constante de equilibrio para la reacción (K= [B]/[A] en equilibrio) está de este modo directamente relacionada con $\Delta G°$ por la reacción anterior, que puede expresarse como sigue:

$$0 = \Delta G° + RT \ln K$$

o

$$\Delta G° = -RT \ln K$$

Si la relación actual [B]/[A] es mayor que la razón de equilibrio (K), $\Delta G > 0$ y la acción procede en el sentido inverso (conversión de B en A). Por otra parte, si la razón [B]/[A] es menor que la razón de equilibrio, $\Delta G < 0$ y A es convertida en B.

La variación de energía libre estándar ($\Delta G°$) de una reacción determina, por tanto, su equilibrio químico y predice en qué dirección progresará la reacción en cualquier conjunto dado de condiciones. Para las reacciones bioquímicas, la variación de energía libre estándar se expresa habitualmente como $\Delta G°'$, que es la variación de energía libre estándar de una reacción en un medio acuoso a pH = 7, aproximadamente las condiciones dentro de una célula.

Muchas reacciones biológicas (como la síntesis de macromoléculas) son termodinámicamente desfavorables ($\Delta G > 0$) en condiciones celulares. Para que estas reacciones puedan progresar, se necesita una fuente adicional de energía. Por ejemplo, considérese la reacción

$$A \rightleftharpoons B \qquad \Delta G = +10 \text{ kcal/mol}$$

La conversión de A en B es energéticamente desfavorable, de modo que la reacción progresa en la dirección inversa en vez de en la directa. Sin embargo, la dirección puede conducirse en la dirección directa acoplando la conversión de A en B con una reacción energéticamente favorable, como:

$$C \rightleftharpoons D \qquad \Delta G = -20 \text{ kcal/mol}$$

Si estas dos reacciones se combinan, la reacción combinada puede escribirse como sigue:

$$A + C \rightleftharpoons B + D \qquad \Delta G = -10 \text{ kcal/mol}$$

La ΔG de la reacción combinada es la suma de las variaciones en la energía libre de sus componentes individuales, así que la reacción combinada es energéticamente favorable y progresará como se describe. De este modo, la conversión energéticamente desfavorable de A en B está facilitada por su combinación con una segunda reacción asociada con una gran disminución en la energía libre. Las enzimas son responsables de llevar a cabo estas reacciones combinadas de una forma coordinada.

La célula utiliza este mecanismo básico para facilitar las muchas reacciones energéticamente desfavorables que deben tener lugar en los sistemas biológicos. El **adenosín 5'-trifosfato (ATP)** desempeña un papel protagonista en este proceso actuando como un depósito de energía libre dentro de

ATP

ADP

AMP

Pirofosfato

célula (Fig. 3.10). Los enlaces entre los fosfatos del ATP se conocen como **enlaces de alta energía** porque su hidrólisis se acompaña de un descenso relativamente grande en la energía libre. No hay nada especial en los enlaces químicos en sí mismos; se denominan enlaces de alta energía sólo porque una gran cantidad de energía libre se libera cuando son hidrolizados dentro de la célula. En la hidrólisis del ATP a ADP más fosfato (P_i), $\Delta G^{\circ\prime}$ = −7,3 kcal/mol. Recuérdese, sin embargo, que $\Delta G^{\circ\prime}$ se refiere a las «condiciones estándar» en las que las concentraciones de todos los productos y reactantes son de 1 *M*. Las concentraciones reales de P_i son aproximadamente de 10^{-2} *M*, y las concentraciones intracelulares de ATP son mayores que las de ADP. Estas diferencias entre las concentraciones intracelulares y las del estado estándar favorecen la hidrólisis de ATP, así que para la hidrólisis de ATP dentro de la célula ΔG es aproximadamente −12 kcal/mol.

De forma alternativa, el ATP puede ser hidrolizado a AMP más pirofosfato (PP_i). Esta reacción produce aproximadamente la misma cantidad de energía libre que la hidrólisis de ATP a ADP. Sin embargo, el pirofosfato producido en esta reacción a su vez rápidamente se hidroliza, con una ΔG similar a la de la hidrólisis de ATP. De este modo, la variación total de energía libre que resulta de la hidrólisis de ATP a AMP es aproximadamente el doble de la obtenida de la hidrólisis de ATP a ADP. En comparación, el enlace entre el azúcar y el grupo fosfato del AMP, en vez de tener alta energía, es un típico enlace covalente; para la hidrólisis de AMP, $\Delta G^{\circ\prime}$ = −3,3 kcal/mol.

Debido al descenso acompañante en la energía libre, la hidrólisis de ATP puede emplearse para promover otras reacciones que requieren energía dentro de la célula. Por ejemplo, la primera reacción de la glicólisis (tratada

Figura 3.10 El ATP como depósito de energía libre. Los enlaces entre los grupos fosfato del ATP se denominan enlaces de alta energía porque su hidrólisis produce un gran descenso de la energía libre. El ATP puede ser hidrolizado bien a ADP más un grupo fosfato (HPO_4^{2-}) o a AMP más pirofosfato. En este último caso, el pirofosfato es a su vez rápidamente hidrolizado, liberando energía libre adicional.

en la siguiente sección) es la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato. La reacción puede escribirse como sigue:

$$\text{Glucosa} + \text{Fosfato } (HPO_4^{2-}) \rightarrow \text{Glucosa- 6-fosfato} + H_2O$$

Debido a que esta reacción es energéticamente desfavorable tal y como está escrita ($\Delta G^{\circ\prime}$ = +3,3 kcal/mol), debe facilitarse en la dirección directa acoplándose a la hidrólisis de ATP ($\Delta G^{\circ\prime}$ = –7,3 kcal/mol):

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + HPO_4^{2-}$$

La reacción combinada puede escribirse como sigue:

$$\text{Glucosa} + ATP \rightarrow \text{Glucosa- 6-fosfato} + ADP$$

La variación de energía libre para esta reacción es la suma de las variaciones de energía libre de las reacciones individuales, así que para la reacción combinada $\Delta G^{\circ\prime}$ = –4,0 kcal/mol, favoreciendo la formación de glucosa-6-fosfato.

Otras moléculas, incluyendo otros nucleótidos trifosfatos (p. ej., guanosina 5-trifosfato, GTP), también tienen enlaces de alta energía y pueden utilizarse como el ATP para promover reacciones que requieren energía. Para la mayoría de las reacciones, sin embargo, el ATP proporciona la energía libre. Las reacciones que producen energía dentro de la célula están, por tanto, acopladas a la síntesis de ATP, mientras que las reacciones que requieren energía están acopladas a la hidrólisis de ATP. Los enlaces de alta energía del ATP desempeñan de este modo un papel crucial en el metabolismo celular al servir como forma de depósito de energía libre utilizable.

Generación de ATP a partir de glucosa

La degradación de carbohidratos, particularmente glucosa, es la fuente principal de energía celular. La degradación oxidativa completa de glucosa a CO_2 y H_2O puede escribirse como sigue:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$$

La reacción produce una gran cantidad de energía libre: $\Delta G^{\circ\prime}$ = –686 kcal/mol. Para convertir esta energía en una forma utilizable, la glucosa se oxida dentro de las células en una serie de pasos acoplados a la síntesis de ATP.

La **glicólisis**, la etapa inicial en la degradación de glucosa, es similar prácticamente en todas las células. La glicólisis ocurre en ausencia de oxígeno y puede proporcionar toda la energía metabólica de organismos anaerobios. En las células aerobias, sin embargo, la glicólisis es sólo la primera etapa en la degradación de glucosa.

Las reacciones de la glicólisis dan lugar a la degradación de glucosa a piruvato, con una ganancia neta de dos moléculas de ATP (Fig. 3.11). Las reacciones iniciales de la vía de hecho consumen energía, usando el ATP para fosforilar la glucosa a glucosa-6-fosfato y luego la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato. Las enzimas que catalizan estas dos reacciones —hexoquinasa y fosfofructoquinasa respectivamente— son importantes puntos reguladores de la vía glucolítica. El principal elemento de control es la fosfofructoquinasa, que es inhibida por niveles altos de ATP. La inhibición de la fosfofructoquinasa da lugar al acúmulo de la glucosa-6-fosfato, que a su vez inhibe a la hexoquinasa. De este modo, cuando la célula tiene un suministro adecuado de energía metabólica disponible en forma de ATP, se inhibe la degradación de glucosa.

Las reacciones que siguen a la formación de fructosa-1,6-difosfato constituyen la parte productora de energía de la vía glucolítica. La degradación de fructosa-1,6-difosfato produce dos moléculas del azúcar de tres carbo-

3.3 Animación web

Glicólisis

La glicólisis es la fase inicial de la degradación de la glucosa, resultando en dos moléculas de piruvato y una ganancia neta de dos moléculas de ATP.

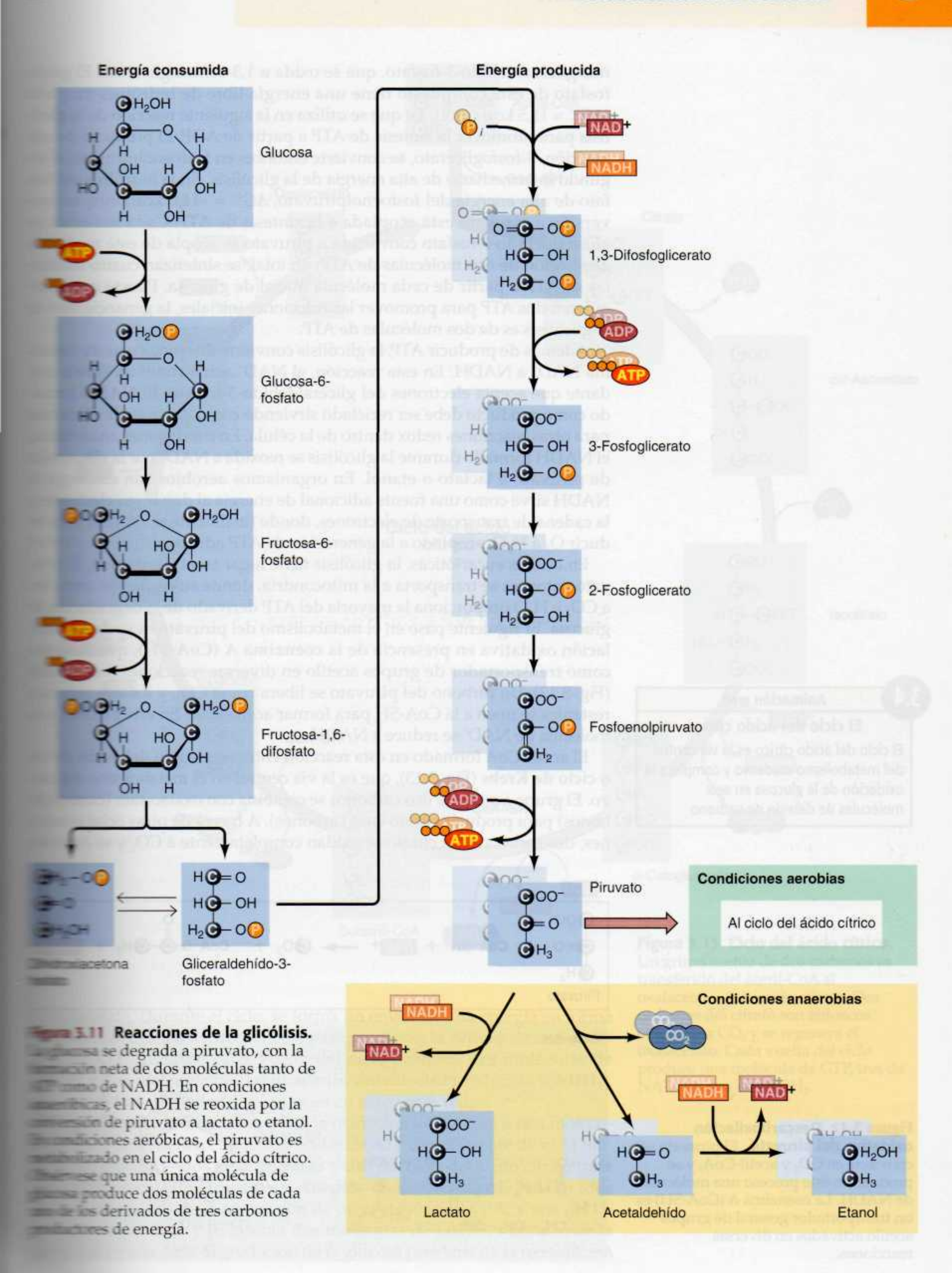


Figura 3.11 Reacciones de la glicólisis. La glucosa se degrada a piruvato, con la formación neta de dos moléculas tanto de ATP como de NADH. En condiciones anaeróbicas, el NADH se reoxida por la conversión de piruvato a lactato o etanol. En condiciones aeróbicas, el piruvato es metabolizado en el ciclo del ácido cítrico. Obsérvese que una única molécula de glucosa produce dos moléculas de cada uno de los derivados de tres carbonos productores de energía.

nos gliceraldehído-3-fosfato, que se oxida a 1,3-difosfoglicerato. El grupo fosfato de este compuesto tiene una energía libre de hidrólisis muy alta ($\Delta G^{\circ\prime}$ = 11,5 kcal/mol), así que se utiliza en la siguiente reacción de la glicólisis para promover la síntesis de ATP a partir de ADP. El producto de esta reacción, 3-fosfoglicerato, se convierte entonces en fosfoenolpiruvato, el segundo intermediario de alta energía de la glicólisis. En la hidrólisis del fosfato de alta energía del fosfoenolpiruvato, $\Delta G^{\circ\prime}$ = –14,6 kcal/mol, su conversión a piruvato está acoplada a la síntesis de ATP. Cada molécula de gliceraldehído-3-fosfato convertida a piruvato se acopla de este modo a la generación de dos moléculas de ATP; en total, se sintetizan cuatro moléculas de ATP a partir de cada molécula inicial de glucosa. Puesto que se requieren dos ATP para promover las reacciones iniciales, la ganancia neta de la glicólisis es de dos moléculas de ATP.

Además de producir ATP, la glicólisis convierte dos moléculas de coenzima NAD^+ a NADH. En esta reacción, el NAD^+ actúa como un agente oxidante que acepta electrones del gliceraldehído-3-fosfato. El NADH formado como producto debe ser reciclado sirviendo como donante de electrones para otras reacciones redox dentro de la célula. En condiciones anaeróbicas, el NADH formado durante la glicólisis se reoxida a NAD^+ por la conversión de piruvato a lactato o etanol. En organismos aerobios, sin embargo, el NADH sirve como una fuente adicional de energía al donar sus electrones a la cadena de transporte de electrones, donde finalmente se utilizan para reducir O_2 a H_2O, acoplado a la generación de ATP adicional.

En células eucarióticas, la glicólisis tiene lugar en el citoplasma. El piruvato entonces se transporta a la mitocondria, donde su oxidación completa a CO_2 y H_2O proporciona la mayoría del ATP derivado de la degradación de glucosa. El siguiente paso en el metabolismo del piruvato es su descarboxilación oxidativa en presencia de la **coenzima A (CoA-SH),** que funciona como transportador de grupos acetilo en diversas reacciones metabólicas (Fig. 3.12). Un carbono del piruvato se libera como CO_2, y los dos carbonos restantes se unen a la CoA-SH para formar acetil-CoA. En este proceso, una molécula de NAD^+ se reduce a NADH.

El acetil-CoA formado en esta reacción entra en el **ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs** (Fig. 3.13), que es la vía central en el metabolismo oxidativo. El grupo acetilo de dos carbonos se combina con oxalacetato (cuatro carbonos) para producir citrato (seis carbonos). A través de otras ocho reacciones, dos carbonos del citrato se oxidan completamente a CO_2 y se regeneran

3.4 Animación web

El ciclo del ácido cítrico

El ciclo del ácido cítrico es la vía central del metabolismo oxidativo y completa la oxidación de la glucosa en seis moléculas de dióxido de carbono

Piruvato + CoA–SH + NAD^+ → CO_2 + CoA–S–CO–CH_3 + NADH

Figura 3.12 Descarboxilación oxidativa del piruvato. El piruvato se convierte en CO_2 y acetil-CoA, y se produce en este proceso una molécula de NADH. La coenzima A (CoA-SH) es un transportador general de grupos acetilo activados en diversas reacciones.

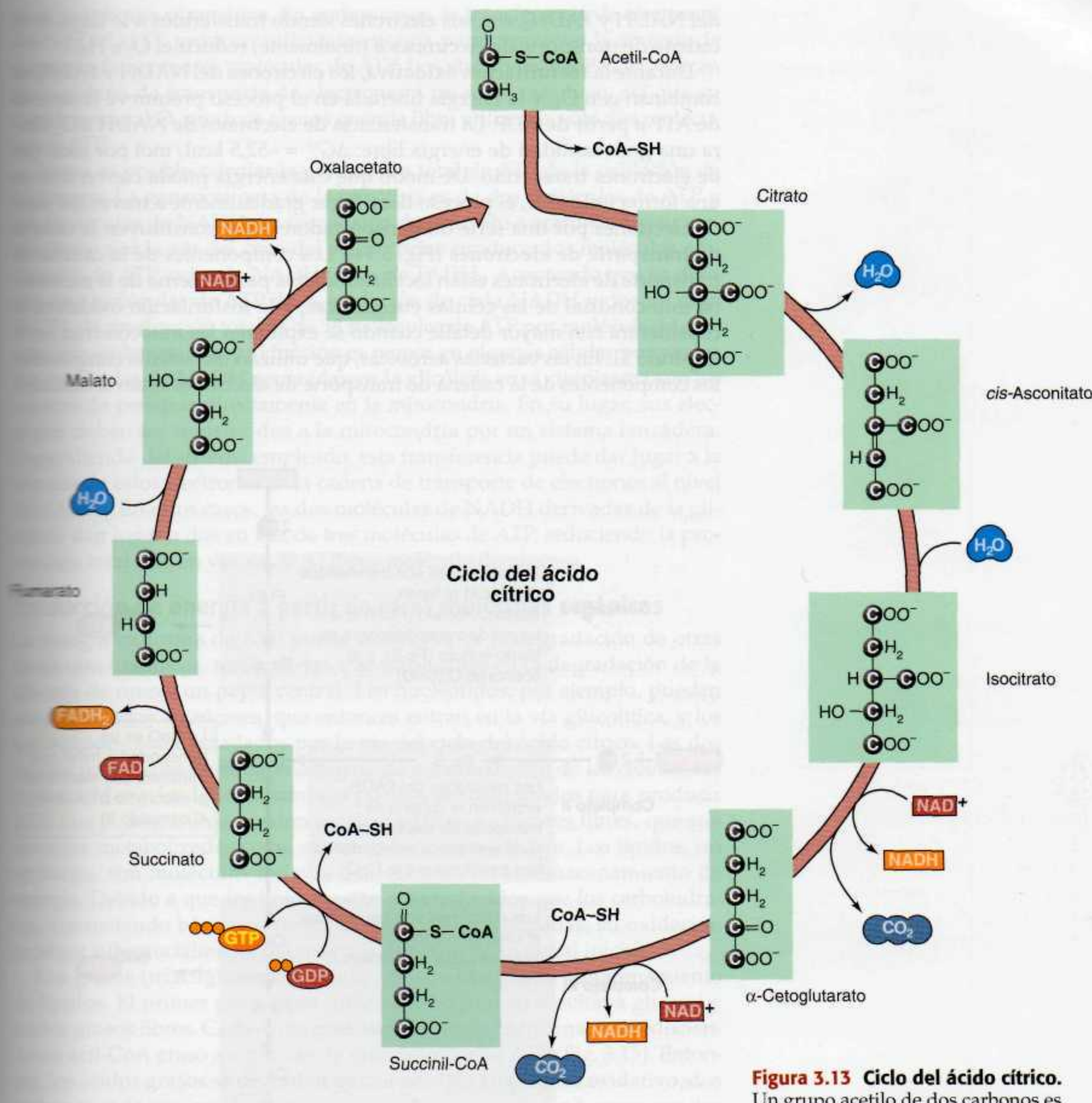


Figura 3.13 Ciclo del ácido cítrico. Un grupo acetilo de dos carbonos es transferido del acetil-CoA al oxalacetato, formando citrato. Dos carbonos del citrato son entonces oxidados a CO_2 y se regenera el oxalacetato. Cada vuelta del ciclo produce una molécula de GTP, tres de NADH y una de $FADH_2$.

el oxalacetato. Durante el ciclo, se forma un enlace de alta energía en forma de GTP, que se emplea directamente para promover la síntesis de una molécula de ATP. Además, cada vuelta del ciclo produce tres moléculas de NADH y una molécula de **flavin adenín dinucleótido** reducida **($FADH_2$)**, que es otro transportador de electrones en reacciones redox.

El ciclo del ácido cítrico completa la oxidación de glucosa a seis moléculas de CO_2. Se obtienen cuatro moléculas de ATP directamente de cada molécula de glucosa —dos de la glicólisis y dos del ciclo del ácido cítrico (una por cada molécula de piruvato)—. Además, diez moléculas de NADH (dos de la glicólisis, dos de la conversión de piruvato a acetil-CoA, y seis del ciclo del ácido cítrico) y se forman dos moléculas de $FADH_2$. El resto de la energía derivada de la degradación de la glucosa proviene de la reoxidación

del NADH y $FADH_2$, con sus electrones siendo transferidos a lo largo de la cadena de transporte de electrones a (finalmente) reducir el O_2 a H_2O.

Durante la **fosforilación oxidativa**, los electrones del NADH y $FADH_2$ se combinan con O_2, y la energía liberada en el proceso promueve la síntesis de ATP a partir de ADP. La transferencia de electrones de NADH a O_2 libera una gran cantidad de energía libre: $\Delta G^{\circ\prime}$ = −52,5 kcal/mol por cada par de electrones transferido. De modo que esta energía pueda convertirse en una forma utilizable, el proceso tiene lugar gradualmente a través del paso de electrones por una serie de transportadores, que constituyen la **cadena de transporte de electrones** (Fig. 3.14). Los componentes de la cadena de transporte de electrones están localizados en la parte interna de la membrana mitocondrial de las células eucarióticas, y la fosforilación oxidativa se considerará con mayor detalle cuando se expliquen las mitocondrias en el Capítulo 11. En las bacterias aeróbicas, que utilizan un sistema comparable, los componentes de la cadena de transporte de electrones están localizados

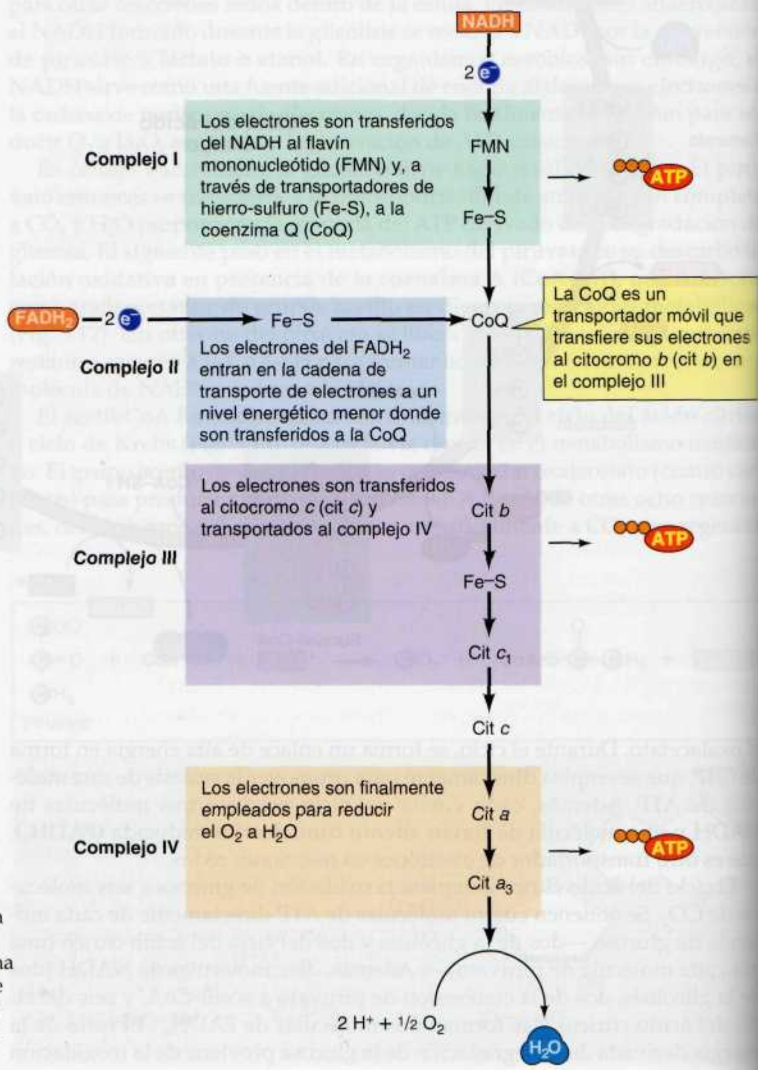


Figura 3.14 Cadena de transporte de electrones. Los electrones del NADH y $FADH_2$ se transfieren al O_2 a través de una serie de transportadores organizados en cuatro complejos proteicos en la membrana mitocondrial. La energía libre derivada de las reacciones de transporte de electrones en los complejos I, III y IV se emplea para promover la síntesis de ATP.

en la membrana plasmática. En ambos casos, la transferencia de electrones del NADH al O_2 produce suficiente energía para promover la síntesis de aproximadamente tres moléculas de ATP. Los electrones del $FADH_2$ entran en la cadena de transporte de electrones a un nivel más bajo, así que su transferencia al O_2 produce menos energía libre utilizable, sólo dos moléculas de ATP.

Ahora es posible calcular la producción total de ATP de la oxidación de la glucosa. La ganancia neta de la glicólisis es de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH. La conversión de piruvato a acetil-CoA y su metabolismo por la vía del ciclo del ácido cítrico produce dos moléculas adicionales de ATP, ocho de NADH y dos de $FADH_2$. Aceptando que se deriven tres moléculas de ATP de la oxidación de cada NADH y dos de cada $FADH_2$, la producción total es de 38 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Sin embargo, esta producción es menor en algunas células porque las dos moléculas de NADH generadas en la glicólisis en el citoplasma son incapaces de penetrar directamente en la mitocondria. En su lugar, sus electrones deben ser transferidos a la mitocondria por un sistema lanzadera. Dependiendo del sistema empleado, esta transferencia puede dar lugar a la entrada de estos electrones en la cadena de transporte de electrones al nivel del $FADH_2$. En estos casos, las dos moléculas de NADH derivadas de la glicólisis dan lugar a dos en vez de tres moléculas de ATP, reduciendo la producción total a 36 en vez de 38 ATP por molécula de glucosa.

Producción de energía a partir de otras moléculas orgánicas

La energía en forma de ATP puede obtenerse de la degradación de otras moléculas orgánicas, teniendo las vías implicadas en la degradación de la glucosa de nuevo un papel central. Los nucleótidos, por ejemplo, pueden ser degradados a azúcares, que entonces entran en la vía glucolítica, y los aminoácidos son degradados por la vía del ciclo del ácido cítrico. Las dos formas principales de almacenamiento de energía dentro de las células, los polisacáridos y los lípidos, también pueden ser degradados para producir ATP. Los polisacáridos pueden ser degradados a azúcares libres, que son entonces metabolizados como se vio en la sección anterior. Los lípidos, sin embargo, son moléculas todavía más eficaces en el almacenamiento de energía. Debido a que los lípidos están más reducidos que los carbohidratos, consistiendo básicamente en cadenas hidrocarbonadas, su oxidación produce substancialmente más energía por peso de material inicial.

Las grasas (triacilgliceroles) son la principal forma de almacenamiento de lípidos. El primer paso en su utilización es su degradación a glicerol y ácidos grasos libres. Cada ácido graso se une a una coenzima A, produciendo un acil-CoA graso a expensas de una molécula de ATP (Fig. 3.15). Entonces, los ácidos grasos se degradan paso a paso en un proceso oxidativo, dos carbonos cada vez, produciendo acetil-CoA más un acil-CoA graso con dos carbonos menos. Cada ronda de oxidación también produce una molécula de NADH y otra de $FADH_2$. El acetil-CoA entra entonces en el ciclo del ácido cítrico, y la degradación del resto del ácido graso continúa del mismo modo.

La degradación de un ácido graso de 16 carbonos produce de este modo siete moléculas de NADH, siete de $FADH_2$, y ocho de acetil-CoA. En términos de generación de ATP, esta producción corresponde a 21 moléculas de ATP derivadas de NADH (3×7), 14 ATP de $FADH_2$ (2×7) y 96 de acetil-CoA (8×12). Como se utilizó un ATP para poner en marcha el proceso, la ganancia neta es de 130 ATP por molécula de ácido graso de 16 carbonos. Compárese esta producción con la ganancia neta de 38 ATP por molécula de glucosa. Puesto que el peso molecular de un ácido graso saturado de 16 carbonos es de 256 y el de la glucosa es de 180, la producción de ATP es apro-

CoA–SH + $CH_3–(CH_2)_{14}–COO^-$
Ácido graso
ATP
AMP + PP_i → 2 P_i
H_2O
$CoA–S–CO–(CH_2)_{14}–CH_3$
C_{16} Acil CoA
FAD → $FADH_2$
$CoA–S–CO–CH{=}CH–(CH_2)_{12}–CH_3$
H_2O
$CoA–S–CO–CH_2–CHOH–(CH_2)_{12}–CH_3$
NAD^+ → NADH + H^+
$CoA–S–CO–CH_2–CO–(CH_2)_{12}–CH_3$
CoA–SH
$CoA–S–CO–CH_3$
Acetil CoA +
$CoA–S–CO–(CH_2)_{12}–CH_3$
C_{14} Acil CoA

Figura 3.15 Oxidación de los ácidos grasos. El ácido graso (p. ej., el ácido graso saturado de 16 carbonos palmitato) inicialmente se une a la coenzima A a expensas de una molécula de ATP. La oxidación del ácido graso progresa entonces con la retirada paso a paso de dos unidades de carbono como acetil-CoA, acoplada a la formación de una molécula de NADH y otra de $FADH_2$.

ximadamente 2,5 veces mayor por gramo de ácido graso —de ahí la ventaja de los lípidos sobre los polisacáridos como moléculas de almacenamiento de energía.

Fotosíntesis

La generación de energía a partir de la oxidación de carbohidratos y lípidos depende de la degradación de compuestos orgánicos preformados. La energía necesaria para la síntesis de estos compuestos se deriva en último término de la luz solar, que se recoge y emplea por las plantas y las bacterias fotosintetizantes para promover la síntesis de carbohidratos. Al convertir la energía de la luz solar en una forma utilizable de energía química, la fotosíntesis es la fuente de prácticamente toda la energía metabólica en los sistemas biológicos.

La ecuación global de la fotosíntesis puede escribirse como sigue:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \xrightarrow{\text{Luz}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

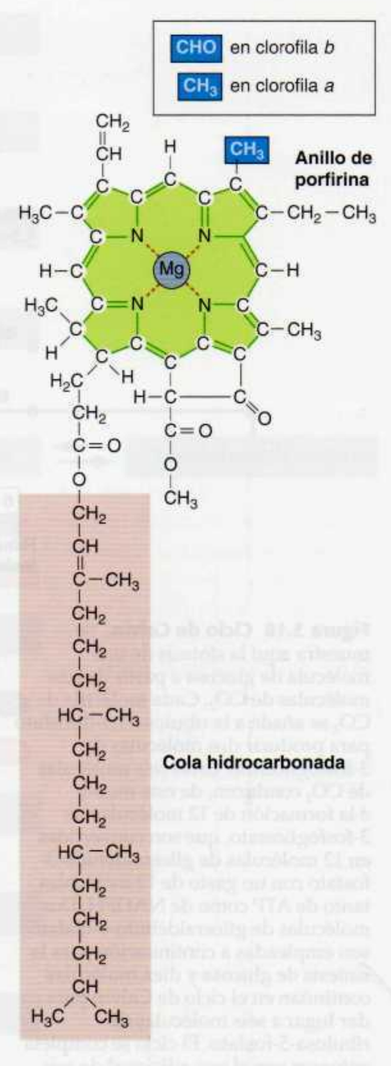
El proceso es mucho más complejo, sin embargo, y tiene lugar en dos etapas distintas. En la primera, llamada las **reacciones luminosas**, la energía absorbida de la luz solar promueve la síntesis de ATP y NADPH (una coenzima similar al NADH), acoplada a la oxidación de H_2O a O_2. El ATP y el NADPH generados en las reacciones luminosas promueven la síntesis de carbohidratos a partir de CO_2 y H_2O en un segundo conjunto de reacciones, llamadas las **reacciones oscuras** porque no requieren luz solar. En células eucariotas, tanto las reacciones luminosas como las oscuras tienen lugar en los cloroplastos.

Los **pigmentos fotosintéticos** capturan energía de la luz solar absorbiendo fotones. La absorción de luz por parte de estos pigmentos provoca que un electrón se mueva de su orbital molecular normal a uno de mayor energía, convirtiendo de este modo la energía de la luz solar en energía química. En las plantas, los pigmentos fotosintéticos más abundantes son las **clorofilas** (Fig. 3.16), que juntas absorben la luz solar de todas las longitudes de onda excepto la verde. Pigmentos adicionales absorben la luz de otras longitudes de onda, así que básicamente el espectro completo de la luz visible puede ser capturado y utilizado para la fotosíntesis.

La energía capturada por la absorción de la luz se emplea para convertir el H_2O en O_2 (Fig. 3.17). Los electrones de alta energía derivados de este proceso entran entonces en una cadena de transporte de electrones, en la que su transferencia por una serie de transportadores está acoplada a la síntesis de ATP. Además, estos electrones de alta energía reducen el $NADP^+$ a NADPH.

En las reacciones oscuras, el ATP y el NADPH producidos en las reacciones luminosas promueven la síntesis de carbohidratos a partir del CO_2 y H_2O. Las moléculas de CO_2 se añaden una a una a un ciclo de reacciones —conocidas como el **ciclo de Calvin**, en honor a su descubridor, Melvin Calvin— que conduce a la formación de carbohidratos (Fig. 3.18). En total, el ciclo de Calvin consume 18 moléculas de ATP y 12 de NADPH por cada molécula de glucosa sintetizada. Se necesitan dos electrones para convertir

Figura 3.16 Estructura de la clorofila. Las clorofilas consisten en estructuras de anillos porfirínicos ligadas a colas hidrocarbonadas. Las clorofilas *a* y *b* difieren en un único grupo funcional en el anillo de porfirina.



cada molécula de $NADP^+$ a NADPH, así que deben pasar 24 electrones por la cadena de transporte de electrones para generar suficiente NADPH para sintetizar una molécula de glucosa. Estos electrones se obtienen de la conversión de 12 moléculas de H_2O a seis moléculas de O_2, lo que produce la formación de seis moléculas de O_2 por cada molécula de glucosa. No está claro, sin embargo, si el paso de estos mismos 24 electrones por la cadena de transporte de electrones es también suficiente para generar los 18 ATP que se requieren para el ciclo de Calvin. Algunas de estas moléculas de ATP pueden generarse en cambio por cadenas de transporte de electrones alternativas que utilizan la energía derivada de la luz solar para sintetizar ATP sin la síntesis de NADPH (véase Cap. 11).

Biosíntesis de los componentes celulares

La sección anterior repasaba las principales reacciones metabólicas a través de las cuales la célula obtiene y almacena energía en forma de ATP. Esta energía metabólica se emplea entonces para realizar diversas tareas, incluyendo la síntesis de macromoléculas y otros constituyentes celulares. De este modo, la energía derivada de la degradación de moléculas orgánicas (catabolismo) se utiliza para promover la síntesis de otros componentes necesarios de la célula. La mayoría de las vías catabólicas implican la oxidación de moléculas orgánicas acoplada a la generación tanto de energía (ATP) como de poder reductor (NADH). En contraste, las vías biosintéticas (anabólicas) generalmente implican la utilización tanto de ATP como de poder reductor (habitualmente en forma de NADPH) para la producción de nuevos compuestos orgánicos. Una vía biosintética importante, la síntesis de carbohidratos a partir de CO_2 y H_2O durante las reacciones oscuras de la fotosíntesis, ya se trató en la sección anterior. Otras vías que conducen a la biosíntesis de los principales constituyentes celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) se revisan en las siguientes secciones.

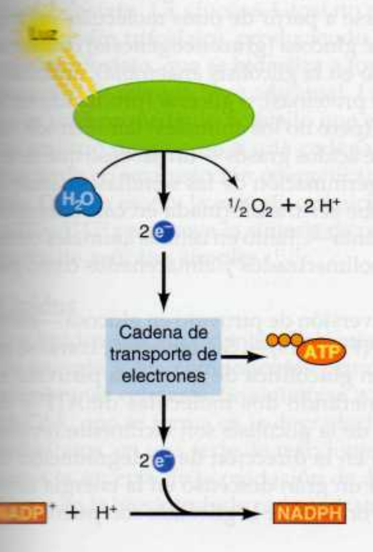


Figura 3.17 Reacciones luminosas de la fotosíntesis. La energía de la luz solar se emplea para escindir el H_2O a O_2. Entonces los electrones de alta energía derivados de este proceso se transportan a través de una serie de transportadores y son empleados para convertir el $NADP^+$ en NADPH. La energía derivada de las reacciones de transporte de electrones también promueve la síntesis de ATP. Los detalles de estas reacciones se tratan en el Capítulo 11.

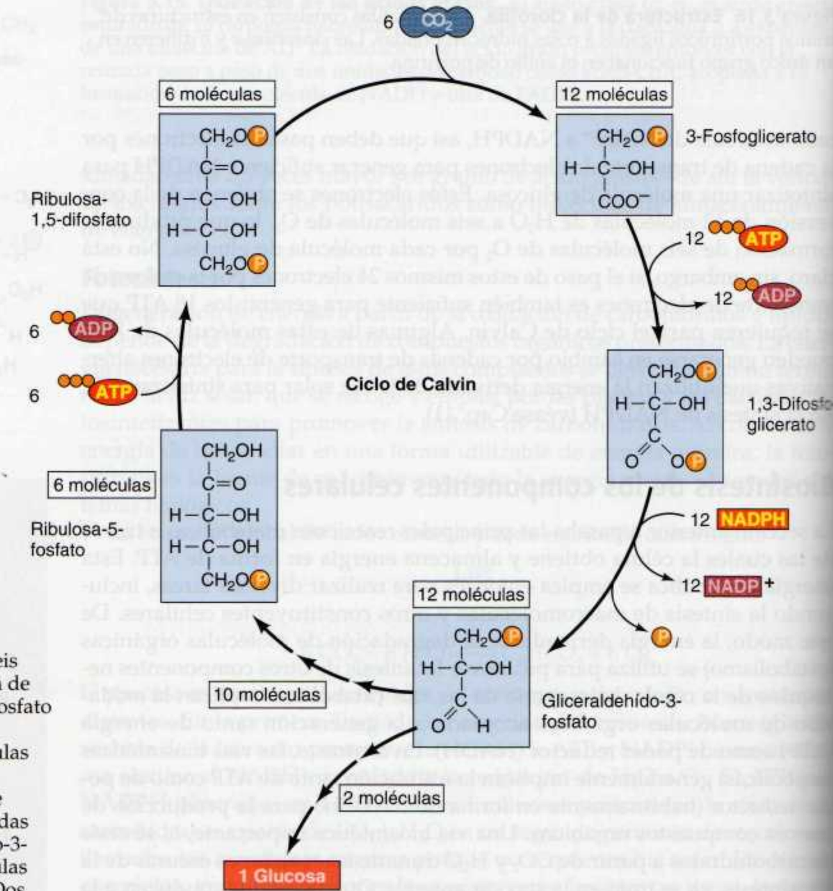


Figura 3.18 Ciclo de Calvin. Se muestra aquí la síntesis de una molécula de glucosa a partir de seis moléculas de CO_2. Cada molécula de CO_2 se añade a la ribulosa-1,5-difosfato para producir dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Estas seis moléculas de CO_2 conducen, de este modo, a la formación de 12 moléculas de 3-fosfoglicerato, que son convertidas en 12 moléculas de gliceraldehído-3-fosfato con un gasto de 12 moléculas tanto de ATP como de NADPH. Dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato son empleadas a continuación para la síntesis de glucosa y diez moléculas continúan en el ciclo de Calvin para dar lugar a seis moléculas de ribulosa-5-fosfato. El ciclo se completa entonces con el uso adicional de seis moléculas de ATP para la síntesis de ribulosa-1,5-difosfato.

3.5 **Animación web**

El ciclo de Calvin

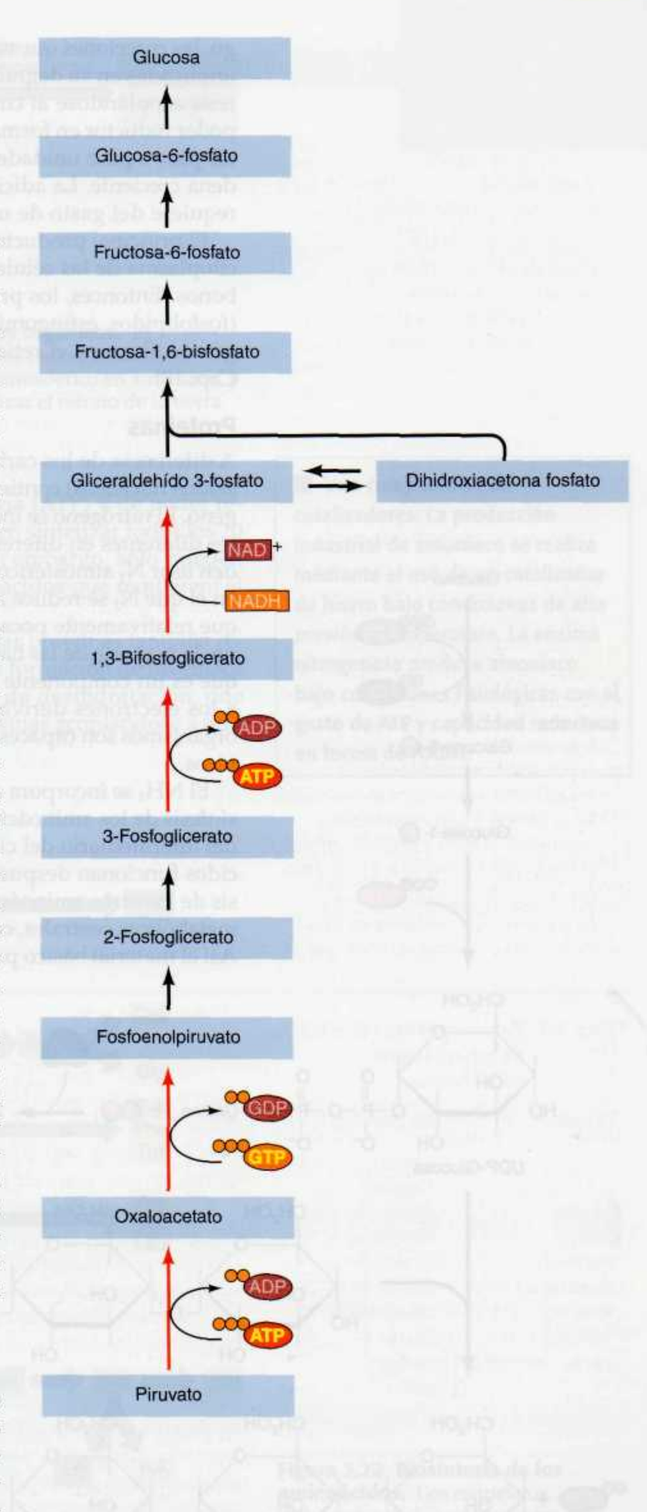
En el ciclo de Calvin de la fotosíntesis, seis moléculas de dióxido de carbono son utilizadas para generar una molécula de glucosa.

Carbohidratos

Además de obtenerse directamente de la alimentación o generada por la fotosíntesis, la glucosa puede sintetizarse a partir de otras moléculas orgánicas. En células animales, la síntesis de glucosa (**gluconeogénesis**) comienza habitualmente con lactato (producido en la glicólisis anaerobia), aminoácidos (derivados de la degradación de proteínas), o glicerol (producido en la degradación de lípidos). Las plantas (pero no los animales) también son capaces de sintetizar glucosa a partir de ácidos grasos —un proceso que es especialmente importante durante la germinación de las semillas, cuando la energía almacenada como grasas debe ser transformada en carbohidratos para sustentar el crecimiento de la planta—. Tanto en células animales como vegetales, los azúcares simples son polimerizados y almacenados como polisacáridos.

La gluconeogénesis implica la conversión de piruvato en glucosa —esencialmente es lo inverso a la glicólisis (Fig. 3.19)—. Sin embargo, como se ha tratado anteriormente, la conversión glucolítica de glucosa a piruvato es una vía productora de energía, generando dos moléculas de ATP y de NADH. Aunque algunas reacciones de la glicólisis son fácilmente reversibles, otras solamente se producirán en la dirección de la degradación de glucosa, porque están asociadas con un gran descenso en la energía libre. Estas reacciones energéticamente favorables de la glicólisis son puentea

Figura 3.19 Glucogénesis. La glucosa es sintetizada a partir de dos moléculas de piruvato, con un coste de cuatro moléculas de ATP, dos moléculas de GTP y dos moléculas de NADH. Los pasos que requieren energía de la gluconeogénesis están indicados mediante flechas rojas.



invierte la gluconeogénesis por otras reacciones (catalizadas por enzimas diferentes) que están acopladas al consumo de ATP y NADH para poder conducirlas en la dirección de la síntesis de glucosa. En total, la generación de glucosa a partir de dos moléculas de piruvato requiere de cuatro moléculas de ATP, dos de GTP y dos de NADH. Este proceso es considerablemente más costoso que la simple inversión de la glicólisis (que requeriría dos moléculas de ATP y dos de NADH), demostrando la necesidad de energía adicional para conducir la vía en la dirección de la biosíntesis.

Tanto en las células animales como en las vegetales, la glucosa se almacena en forma de polisacáridos (glucógeno y almidón, respectivamente). La síntesis de polisacáridos, como la del resto de macromoléculas, es una reacción que requiere energía. Como se comentó en el Capítulo 2, la unión de dos azúcares por un enlace glucosídico puede describirse como una reacción de deshidratación, donde se retira H_2O (véase Fig. 2.3). Dicha reacción, sin embargo, es energéticamente desfavorable y por tanto incapaz de progresar en la dirección directa. En consecuencia, la formación de un enlace glucosídico debe estar acoplada a una reacción productora de energía, que se consigue empleando azúcares nucleotídicos como intermediarios en la síntesis de polisacáridos (Fig. 3.20). En primer lugar, la glucosa se fosforila en una reacción promovida por ATP a glucosa-6-fosfato, que entonces se convierte en glucosa-1-fosfato. La glucosa-1-fosfato reacciona con UTP (uridín trifosfato), produciendo UDP-glucosa más pirofosfato, que se hidroliza a fosfato con la liberación de energía libre adicional. La UDP-glucosa es un intermediario activado que entonces dona su residuo de glucosa a una cadena polisacárida creciente en una reacción energéticamente favorable. De este modo, la energía química en forma de ATP y UTP promueve la síntesis de polisacáridos a partir de azúcares simples.

Lípidos

Los lípidos son importantes moléculas de depósito de energía y los componentes principales de las membranas celulares. Se sintetizan a partir de acetil-CoA, que se forma en la degradación de los carbohidratos, en una serie de reacciones que se parecen a la inversa de la oxidación de ácidos grasos. Como en la biosíntesis de carbohidratos, sin embar-

go, las reacciones que conducen a la síntesis de ácidos grasos difieren de las implicadas en su degradación y son impulsadas en la dirección de la biosíntesis acoplándose al consumo tanto de energía en forma de ATP como de poder reductor en forma de NADPH. Los ácidos grasos se sintetizan al añadir paso a paso unidades de dos carbonos derivados de acetil-CoA a una cadena creciente. La adición de cada una de estas unidades de dos carbonos requiere del gasto de una molécula de ATP y dos moléculas de NADPH.

El principal producto de la biosíntesis de ácidos grasos, que sucede en el citoplasma de las células eucariotas, es el palmitato, ácido graso de 16 carbonos. Entonces, los principales componentes de las membranas celulares (fosfolípidos, esfingomielina y glucolípidos) se sintetizan a partir de ácidos grasos libres en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi (véase Cap. 10).

Proteínas

A diferencia de los carbohidratos y los lípidos, las proteínas (así como los ácidos nucleicos) contienen nitrógeno además de carbono, hidrógeno y oxígeno. El nitrógeno se incorpora a los compuestos orgánicos a partir de fuentes diferentes en diferentes organismos (Fig. 3.21). Algunas bacterias pueden usar N_2 atmosférico por un proceso denominado **fijación de nitrógeno**, en el que N_2 se reduce a NH_3 a expensas de energía en forma de ATP. Aunque relativamente pocas especies de bacterias son capaces de fijar nitrógeno, la mayoría de las bacterias, hongos y plantas pueden usar nitrato (NO_3^-), que es un componente frecuente de la tierra, reduciéndolo a NH_3 gracias a los electrones derivados del NADH o NADPH. Finalmente, todos los organismos son capaces de incorporar amoníaco (NH_3) a componentes orgánicos.

El NH_3 se incorpora a las moléculas orgánicas principalmente durante la síntesis de los aminoácidos glutamato y glutamina, que se obtienen a partir del intermediario del ciclo del ácido cítrico, α-cetoglutarato. Estos aminoácidos funcionan después como donantes de grupos amino durante la síntesis de los otros aminoácidos, que también se producen a partir de otras vías metabólicas centrales, como la glicólisis o el ciclo del ácido cítrico (Fig. 3.22). Así el material básico para la síntesis de aminoácidos se obtiene de la gluco-

Figura 3.20 Síntesis de polisacáridos. La glucosa se convierte primero en una forma activada, UDP-glucosa, a costa de una molécula de ATP y otra de UTP. El residuo de glucosa entonces puede transferirse de la UDP-glucosa a una cadena polisacárida creciente en una reacción energéticamente favorable.

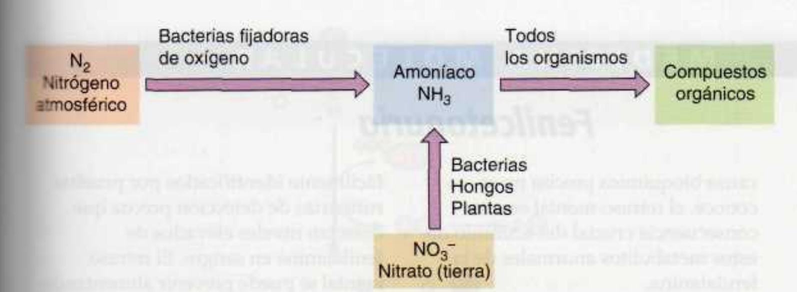


Figura 3.21 Asimilación de nitrógeno a los compuestos orgánicos. El amoníaco se incorpora a los compuestos orgánicos en todos los organismos. Algunas bacterias son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico en amoníaco, y la mayoría de las bacterias, hongos y plantas pueden utilizar el nitrato de la tierra.

sa, y los aminoácidos se sintetizan a costa de energía (ATP) y de poder reductor (NADPH). Muchas bacterias y plantas pueden sintetizar todos los 20 aminoácidos. Los humanos y otros mamíferos, sin embargo, sólo pueden sintetizar aproximadamente la mitad de los aminoácidos que requieren; el resto debe obtenerse de la dieta (Tabla 3.2).

La polimerización de los aminoácidos para formar proteínas también requiere energía. Como la síntesis de polisacáridos, la formación de un enlace peptídico puede considerarse como una reacción de deshidratación, que debe realizarse en la dirección de la síntesis de proteínas acoplándose a otra

■ Una comparación de catalizadores: La producción industrial de amoniaco se realiza mediante el uso de un catalizador de hierro bajo condiciones de alta presión y temperatura. La enzima *nitrogenasa produce amoniaco* bajo condiciones fisiológicas con el gasto de ATP y capacidad reductora en forma de NADH.

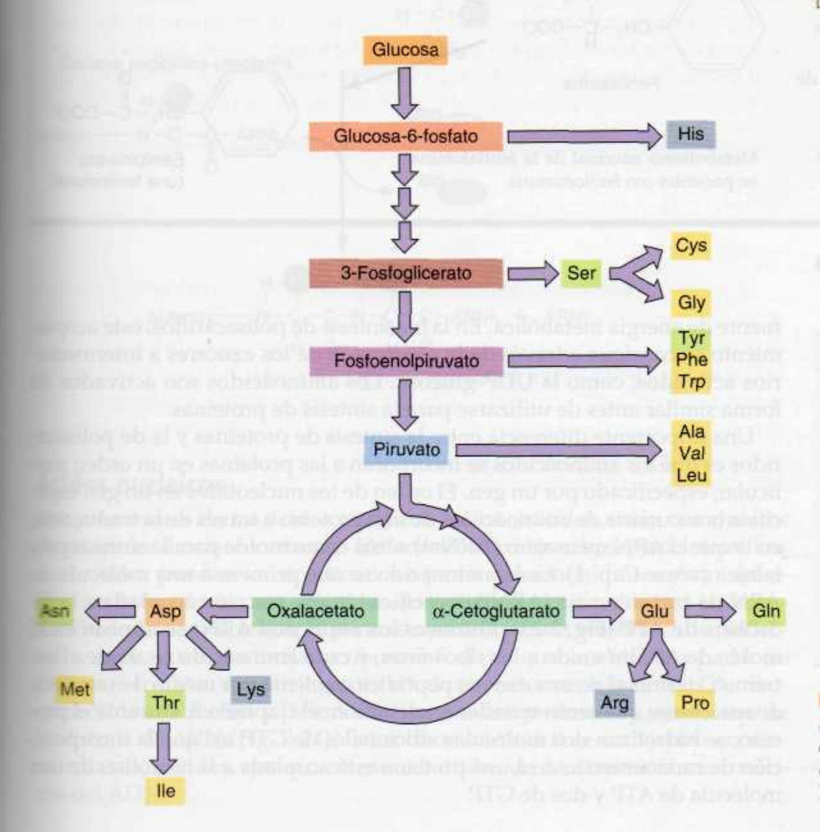
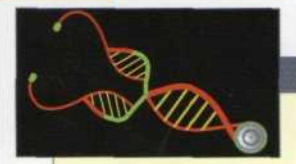


Figura 3.22 Biosíntesis de los aminoácidos. Los esqueletos carbonados de los aminoácidos se obtienen a partir de intermediarios de la glicólisis y del ciclo del ácido cítrico.



MEDICINA MOLECULAR

Fenilcetonuria

Enfermedad

La fenilcetonuria, o FCN, es un error congénito del metabolismo de los aminoácidos con efectos devastadores. Afecta aproximadamente a uno de cada 10.000 recién nacidos y, si no se trata, provoca un retraso mental severo. Afortunadamente, el conocimiento de la naturaleza del defecto responsable de la fenilcetonuria ha permitido su diagnóstico precoz y tratamiento eficaz.

Bases moleculares y celulares

La fenilcetonuria se debe a una deficiencia en la enzima fenilalanina *hidroxilasa, que convierte la* fenilalanina en tirosina. Esta deficiencia provoca que la *fenilalanina se acumule a niveles muy* altos y sufra otras reacciones, como la conversión en fenilpiruvato. La *fenilalanina, el fenilpiruvato y otros* metabolitos anormales se acumulan en la sangre y son excretados a niveles altos en la orina (el nombre de la enfermedad procede de los altos niveles de fenilpiruvato, una fenilcetona, encontrados en la orina de los niños afectados). Aunque la causa bioquímica precisa no se conoce, el retraso mental es una consecuencia crucial del acúmulo de estos metabolitos anormales de la fenilalanina.

Prevención y tratamiento

La deficiencia enzimática no produce dificultades mientras el feto está en el útero, así que los niños con fenilcetonuria son normales al nacer. Si no son tratados, sin embargo, los niños afectados se vuelven permanente y profundamente retrasados en el primer año de vida. Afortunadamente, los recién nacidos con fenilcetonuria pueden ser fácilmente identificados por pruebas rutinarias de detección precoz que detectan niveles elevados de fenilalanina en sangre. El retraso mental se puede prevenir alimentando a los niños afectados con una dieta sintética baja en fenilalanina. Este tratamiento dietético elimina el acúmulo de metabolitos tóxicos de la fenilalanina y previene eficazmente el retraso mental que se produciría de otro modo. La detección precoz rutinaria de la fenilcetonuria es por tanto una prueba crucial en todos los recién nacidos.

Fenilalanina hidroxilasa

Fenilalanina → Tirosina

Fenilalanina → Fenilpiruvato (una fenilcetona)

Metabolismo anormal de la fenilalamina en pacientes con fenilcetonuria.

Tabla 3.2 Requerimientos dietéticos de aminoácidos en el hombre

Esencial	No esencial
Histidina	Alanina
Isoleucina	Arginina[a]
Leucina	Asparagina
Lisina	Aspartato
Metionina	Cisteína
Fenilalanina	Glutamato
Treonina	Glutamina
Triptófano	Glicina
Valina	Prolina
	Serina
	Tirosina

Los aminoácidos esenciales deben obtenerse de la dieta; los aminoácidos no esenciales pueden ser sintetizados por células humanas.

[a]Aunque la arginina se clasifica como un aminoácido no esencial, los niños en crecimiento deben tener un aporte de arginina adicional en su dieta.

fuente de energía metabólica. En la biosíntesis de polisacáridos, este acoplamiento se consigue a través de la conversión de los azúcares a intermediarios activados, como la UDP-glucosa. Los aminoácidos son activados de forma similar antes de utilizarse para la síntesis de proteínas.

Una importante diferencia entre la síntesis de proteínas y la de polisacáridos es que los aminoácidos se incorporan a las proteínas en un orden particular, especificado por un gen. El orden de los nucleótidos en un gen especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína a través de la traducción, en la que el ARN mensajero (ARNm) actúa como molde para la síntesis proteínica (véase Cap. 4). Cada aminoácido se une primero a una molécula de ARN de transferencia (ARNt) específica en una reacción acoplada a la hidrólisis de ATP (Fig. 3.23). Entonces los *aminoacil ARNt* se alinean en el molde de ARNm unido a los ribosomas, y cada aminoácido se añade al extremo C terminal de una cadena peptídica creciente por medio de una serie de reacciones que serán tratadas en detalle en el Capítulo 8. Durante el proceso, se hidrolizan dos moléculas adicionales de GTP, así que la incorporación de cada aminoácido a una proteína está acoplada a la hidrólisis de una molécula de ATP y dos de GTP.

Figura 3.23 Formación de un enlace peptídico. Un aminoácido es activado primero a través de la unión a su ARNt en una reacción de dos pasos que implica la hidrólisis de ATP a AMP. Los ARNt sirven como adaptadores para alinear los aminoácidos en un molde de ARNm unido a ribosomas. Cada aminoácido es transferido entonces al extremo C terminal de una cadena peptídica creciente a costa de dos moléculas adicionales de GTP.

Ácidos nucleicos

Los precursores de los ácidos nucleicos, los nucleótidos, están compuestos de azúcares de cinco carbonos fosforilados unidos a bases nucleicas. Los nucleótidos pueden ser sintetizados a partir de carbohidratos y aminoácidos; también pueden ser obtenidos de la dieta o reutilizados tras la degradación de ácidos nucleicos. El punto de partida para la biosíntesis de nucleótidos es el azúcar fosforilado ribosa-5-fosfato, que se obtiene a partir de glucosa-6-fosfato. Vías divergentes conducen entonces a la síntesis de ribonucleótidos de purina y pirimidina, que son los precursores inmediatos de la síntesis de ARN (Fig. 3.24). Estos ribonucleótidos se convierten en desoxirribonucleótidos, que sirven como ladrillos de construcción monoméricos del ADN.

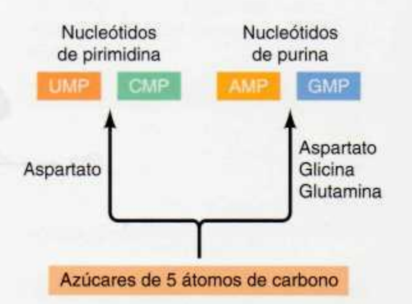


Figura 3.24 Biosíntesis de nucleótidos de purina y pirimidina. Los nucleótidos de purina y pirimidina se sintetizan a partir de azúcares de 5 átomos de carbono y aminoácidos.



EXPERIMENTO CLAVE

Antimetabolitos y quimioterapia

Antagonistas de derivados de ácidos nucleicos VI. Purinas
Gertrude B. Elion, George H. Hitchings y Henry Vanderwerff
Wellcome Research Laboratories, Tuckahoe, NY
Journal of Biological Chemistry, Volumen 192, 1951, págs. 505-518

Contexto

Gertrude Elion y George Hitchings empezaron una colaboración en 1944 que duró más de 20 años y dio lugar al desarrollo de medicinas que han sido eficientes para el tratamiento de cáncer, gota, virus e infecciones parasitarias. El principio de su enfoque para el desarrollo de medicinas se basaba en la teoría del antimetabolito, que inicialmente proponía que algunas moléculas activas frente a bacterias funcionaban previniendo la utilización de los nutrientes esenciales (metabolitos) por parte de las células bacterianas. Elion y Hitchings sugirieron que el crecimientos de células que se dividen rápidamente, como las células cancerosas, podría inhibirse mediante análogos de las bases de los ácidos nucleicos que interfiriesen con la síntesis normal del ADN. Procedieron a ensayar esta hipótesis sintetizando un gran número de compuestos relacionados con las purinas y ensayando sus efectos biológicos. Estos estudios dieron lugar al descubrimiento de que la 6-mercaptopurina era un potente inhibidor de la utilización de purina en bacterias, a lo que rápidamente le siguieron estudios mostrando que era un medicamento eficaz para el tratamiento de leucemia aguda en niños.

Experimentos

Elion y Hitchings eligieron ensayar las actividades potenciales de análogos de purina sobre el crecimiento de la bacteria *Lactobacilus casei*. En 1948, encontraron que el compuesto 2,6-diaminopurina inhibía el crecimiento de *L. casei* interfiriendo con el metabolismo normal de las purinas. Extendieron sus ensayos en su trabajo de 1951 ensayando los efectos de 100 purinas diferentes, con sustituciones de grupos amino, hidroxilo, metilo, cloro, sulfhidrilo y otros grupos químicos en diferentes posiciones del anillo de purina. Dos compuestos, la 6-mercaptopurina y la 6-tioguanina, en los que el oxígeno estaba sustituido por sulfuro en la posición 6 de la guanina y la hipoxantina, resultaron ser fuertes inhibidores del crecimiento bacteriano (véase figura). Estos compuestos resultaron ser inhibidores activos de una variedad de cánceres en roedores, dando lugar al primer ensayo de la 6-mercaptopurina como tratamiento de leucemia infantil. Los resultados de este ensayo tuvieron un éxito espectacular, y la 6-mercaptopurina fue aprobada para el tratamiento de leucemia infantil

El ARN y ADN son polímeros de nucleósidos monofosfato. Como para otras macromoléculas, sin embargo, la polimerización directa de nucleósidos monofosfato es energéticamente desfavorable, y la síntesis de polinucleótidos utiliza en su lugar nucleósidos trifosfatos como precursores activados (Fig. 3.25). Un nucleósido 5'-trifosfato se añade a un grupo 3' hidroxilo de una cadena polinucleotídica creciente, con la liberación y posterior hidrólisis de pirofosfato como promotor de la reacción en la dirección de la síntesis de polinucleótidos.

Figura 3.25 Síntesis de polinucleótidos. Nucleósidos trifosfato se unen al extremo 3' de una cadena polinucleotídica creciente con la liberación de pirofosfato.

EXPERIMENTO CLAVE

SH

6-Tioguanina

SH

6-Mercaptopurina

Estructuras de la 6-tioguanina y la 6-mercaptopurina

por la Food and Drug Administration en 1953, tan sólo dos años después de su síntesis y de la demostración inicial de su actividad como un antimetabolito de purina en bacterias.

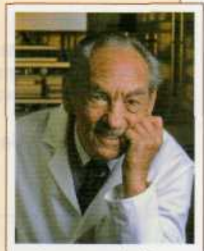
Impacto

El éxito de la 6-mercaptopurina en el tratamiento de la leucemia infantil proporcionó pruebas convincentes de que los inhibidores del metabolismo de ácidos nucleicos podían ser medicamentos efectivos frente al cáncer. Este sigue siendo el caso hoy en día, y la 6-mercaptopurina sigue siendo uno de los medicamentos empleados con éxito para el tratamiento de la leucemia. Adicionalmente, un número de otros antimetabolitos que interfieren con el metabolismo de los ácidos nucleicos, han resultado ser útiles en la terapia contra el cáncer.

Gertrude Elion y George Hitchings continuaron su trabajo en colaboración sobre los antimetabolitos de purina hasta la jubilación de Hitchings en 1967. Además de la 6-mercaptopurina, desarrollaron medicamentos que se utilizan para la inmunosupresión después del trasplante de tejidos, para el tratamiento de artritis reumatoide, el tratamiento de gota, y para el tratamiento de infecciones parasitarias. Después de la jubilación de Hitchings, Elion centró su investigación en el tratamiento de infecciones virales y desarrolló el primer medicamento eficaz contra las infecciones víricas humanas —el análogo de la guanina aciclovir, que es muy activo frente al herpes simplex y otros herpesvirus—. Éxitos consiguientes al desarrollo de antimetabolitos de ácidos nucleicos como medicamentos antivirales incluyen el análogo de la timina AZT, que es ampliamente utilizado como inhibidor de VIH en el tratamiento de SIDA. El trabajo pionero de Elion y Hitchings ha abierto diversas nuevas áreas de investigación y ha tenido un profundo impacto sobre el tratamiento de una amplia gama de enfermedades.



Gertrude B. Elion



George H. Hitchings

Cadena polinucleotídica creciente

Extremo 5'

Base n–1

OH OH

Extremo 3'

Nucleósido trifosfato

Extremo 5'

n–1

n

Extremo 3' OH OH

H_2O

$2 P_i$

PALABRAS CLAVE

RESUMEN

PAPEL CENTRAL DE LAS ENZIMAS COMO CATALIZADORES BIOLÓGICOS

enzima, sustrato, producto, estado de transición, energía de activación, sitio activo

Actividad catalítica de las enzimas: Prácticamente todas las reacciones químicas dentro de las células son catalizadas por enzimas.

modelo de la llave y la cerradura, ajuste inducido

Mecanismos de catálisis enzimática: Las enzimas incrementan la velocidad de las reacciones uniendo sustratos en la posición adecuada, alterando la conformación de los sustratos para aproximarlos al estado de transición, y participando directamente en las reacciones químicas.

grupo prostético, coenzima, nicotidamín adenín dinucleótido (NAD^+)

Coenzimas: Las coenzimas trabajan junto con las enzimas para transportar grupos bioquímicos entre sustratos.

inhibición por retroalimentación, regulación alostérica, fosforilación

Regulación de la actividad enzimática: Las actividades de las enzimas son reguladas para cubrir las necesidades fisiológicas de la célula. La actividad enzimática puede ser controlada a través de la unión de moléculas pequeñas, de interacciones con otras proteínas y de modificaciones covalentes.

ENERGÍA METABÓLICA

energía libre de Gibbs (G), adenosina 5′-trifosfato (ATP), enlace de alta energía

Energía libre y ATP: El ATP funciona como un depósito de energía libre, que es empleado para promover reacciones que requieren energía dentro de las células.

glicólisis, coenzima A (CoA-SH), ciclo del ácido cítrico, ciclo de Krebs, flavín adenín dinucleótido ($FADH_2$), fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones

Generación de ATP a partir de glucosa: La degradación de glucosa es una fuente importante de energía celular. En células aeróbicas, la oxidación completa de la glucosa produce entre 36 y 38 moléculas de ATP. La mayoría de este ATP se deriva de las reacciones de transporte de electrones en las que el O_2 es reducido a H_2O.

Obtención de energía de otras moléculas orgánicas: El ATP también puede ser obtenido a partir de la degradación de otras moléculas orgánicas aparte de la glucosa. Debido a que las grasas están más reducidas que los carbohidratos, proporcionan una fuente más eficaz de almacenamiento de energía.

reacciones luminosas, reacciones oscuras, pigmentos fotosintéticos, clorofila, ciclo de Calvin

Fotosíntesis: La energía requerida para la síntesis de moléculas orgánicas se obtiene en último término de la luz solar, que es aprovechada por las plantas y las bacterias fotosintéticas. En la primera etapa de la fotosíntesis, la energía de la luz solar se emplea para promover la síntesis de ATP y NADPH, acoplada a la oxidación de H_2O a O_2. El ATP y el NADPH producidos en estas reacciones son empleados entonces para sintetizar glucosa a partir de CO_2 y H_2O.

BIOSÍNTESIS DE LOS COMPONENTES CELULARES

gluconeogénesis

Carbohidratos: La glucosa puede ser sintetizada a partir de otras moléculas orgánicas, empleando energía y poder reductor en forma de ATP y NADH, respectivamente. Entonces se necesita ATP adicional para promover la síntesis de polisacáridos a partir de azúcares simples.

Lípidos: Los lípidos son sintetizados a partir de acetil CoA, que se forma en la degradación de los carbohidratos.

RESUMEN

Proteínas: Los aminoácidos son sintetizados a partir de intermediarios de la glicólisis y del ciclo del ácido cítrico. Su polimerización para formar proteínas requiere energía adicional en forma de ATP y GTP.

Ácidos nucleicos: Los nucleótidos de purina y pirimidina son sintetizados a partir de carbohidratos y aminoácidos. Su polimerización a ADN y ARN es promovida por la utilización de nucleósidos trifosfatos como precursores activados.

PALABRAS CLAVE

fijación de nitrógeno

Preguntas

1. El «bolsillo» de unión de la tripsina contiene un residuo de aspartato. ¿Cómo crees que afectaría a la actividad enzimática el cambiar este aminoácido por lisina?

2. ¿Qué característica de la histidina le permite jugar un papel en reacciones enzimáticas que implican el intercambio de iones de hidrógeno?

3. A continuación hay una vía para la biosíntesis de la molécula D catalizada por las enzimas E1, E2 y E3.

$$A \xrightarrow{E1} B \xrightarrow{E2} C \xrightarrow{E3} D$$

Estás estudiando la reacción catalizada por E1 en ausencia de las otras enzimas. Encuentras que la tasa de la reacción desciende a medida que aumentas las concentraciones de D. ¿Qué indica este resultado sobre el mecanismo de regulación de la enzima E1?

4. Muchas reacciones bioquímicas son energéticamente desfavorables bajo condiciones fisiológicas ($\Delta G^{\circ\prime} > 0$). ¿Cómo lleva a cabo la célula estas reacciones?

5. Considera la siguiente reacción:

Fructosa-6-fosfato + $HPO_4^{2-} \rightleftharpoons$ Fructosa-1,6-difosfato + H_2O, $\Delta G^{\circ\prime} = +4$ kcal/mol

Conociendo la variación de energía libre estándar para la hidrólisis de ATP (–7,3 kcal/mol), calcula la variación de energía libre estándar para la reacción catalizada por la fosfofructoquinasa.

6. Considera la reacción $A \rightleftharpoons B + C$, en la que $\Delta G^{\circ\prime} = -3{,}5$ kcal/mol. Calcula ΔG en condiciones intracelulares, sabiendo que la concentración de A es 10^{-2} *M* y las concentraciones de B y C son ambas de 10^{-3} *M*. ¿En qué dirección progresará la reacción en la célula? Para tus cálculos, $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal/mol/grado y $T = 298$ K (25 °C). Recuerda que $\ln(x) = 2{,}3 \log_{10}(x)$.

7. ¿Cómo se vería afectada la glicólisis por un incremento en la concentración de ATP celular?

8. Las levaduras pueden crecer bajo condiciones anaeróbicas además de bajo condiciones aeróbicas. Por cada molécula de glucosa consumida, ¿cuántas moléculas de ATP serán generadas por levaduras crecidas en condiciones anaeróbicas en comparación con las condiciones aeróbicas?

9. ¿Cómo regeneran los organismos anaeróbicos NAD^+ a partir del NADH que se producen durante la glicólisis?

10. ¿Por qué los lípidos son más eficientes como moléculas de almacenamiento de energía que los carbohidratos?

11. Diferencia entre las reacciones de la fase lumínica y la fase oscura de la fotosíntesis.

12. ¿Por qué la gluconeogénesis no es una simple reversión de la glicólisis?

Bibliografía

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer. 2002. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W. H. Freeman.

Mathews, C. K., K. E. van Holde and K. G. Ahern. 2000. *Biochemistry*. 3rd ed. Redwood City, CA: Benjamin Cummings.

Nelson, D. L. and M. M. Cox. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York: W. H. Freeman.

Papel central de las enzimas como catalizadores biológicos

Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. New York: W. H. Freeman.

Koshland, D. E. 1984. Control of enzyme activity and metabolic pathways. *Trends Biochem. Sci.* 9: 155–159. [R]

Lienhard, G. E. 1973. Enzymatic catalysis and transition-state theory. *Science* 180: 149–154. [R]

Lipscomb, W. N. 1983. Structure and catalysis of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 17–34. [R]

Monod, J., J.-P. Changeux and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6: 306–329. [P]

Narlikar, G. J. and D. Herschlag. 1997. Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: Lessons from comparison of RNA and protein enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 19–59. [R]

Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224: 350–357. [R]

Petsko, G. A. and D. Ringe. 2003. *Protein Structure and Function*. Sunderland, MA: Sinauer.

Schramm, V. L. 1998. Enzymatic transition states and transition state analog design. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 693–720. [R]

Energía metabólica

Beinert, H., R. H. Holm and E. Munck. 1997. Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277: 653–659. [R]

Bennett, J. 1979. The protein that harvests sunlight. *Trends Biochem. Sci.* 4: 268–271. [R]

Calvin, M. 1962. The path of carbon in photosynthesis. *Science* 135: 879–889. [R]

Deisenhofer, J. and H. Michel. 1991. Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 1–23. [R]

Krebs, H. A. 1970. The history of the tricarboxylic cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14: 154–170. [R]

Kuhlbrandt, W., D. N. Wang and Y. Fujiyoshi. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614–621. [P]

Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 2002. *Bioenergetics.* 3rd ed. London: Academic Press.

Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283: 1488–1493. [R]

Biosíntesis de los componentes celulares

Hers, H. G. and L. Hue. 1983. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 617–653. [R]

Jones, M. E. 1980. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: Genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 253–279. [R]

Kornberg, A. and T. A. Baker. 1991. *DNA Replication.* 2nd ed. New York: W. H. Freeman.

Tolbert, N. E. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 133–157. [R]

Umbarger, H. E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 533–606. [R]

Van den Bosch, H., R. B. H. Schutgens, R. J. A. Wanders and J. M. Tager. 1992. Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 157–197. [R]

Wakil, S. J., J. K. Stoops and V. C. Joshi. 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 537–579. [R]

CAPÍTULO 4

Fundamentos de biología molecular

LA BIOLOGÍA MOLECULAR CONTEMPORÁNEA se ocupa principalmente de la comprensión de los mecanismos responsables de la transmisión y expresión de la información genética que en último término determinan la estructura y función celulares. Como fue expuesto en el Capítulo 1, todas las células comparten un número de propiedades básicas, y esta unidad subyacente de la biología celular es particularmente evidente en el nivel molecular. Tal unidad ha permitido a los científicos elegir organismos sencillos (como las bacterias) como modelos para muchos experimentos fundamentales asumiendo que mecanismos moleculares similares son comunes en organismos tan distintos como *E. coli* y el organismo humano. Numerosos experimentos han demostrado la validez de esta premisa, y actualmente es evidente que la biología molecular celular proporciona un marco unificador para comprender diversos aspectos del comportamiento celular.

Los avances iniciales en biología molecular se lograron aprovechando el rápido crecimiento y la facilidad de manipulación del genoma de bacterias sencillas como *E. coli*, y sus virus. A continuación, el desarrollo del ADN recombinante permitió establecer tanto los principios fundamentales, como diversos procedimientos experimentales desarrollados en un principio en procariotas y aplicados posteriormente a células eucariotas. La aplicación de la tecnología del ADN recombinante ha tenido un enorme impacto, inicialmente permitiendo el aislamiento y caracterización de genes eucarióticos individuales, y más recientemente permitiendo la determinación de secuencias completas del genoma de animales y plantas superiores, incluyendo el humano.

Herencia, genes y ADN

Quizá la propiedad fundamental de todos los seres vivos es la capacidad de reproducirse. Todos los organismos heredan de sus progenitores la información genética especificando su estructura y función. De igual forma, todas las células provienen de otras células preexistentes, por lo que el material genético ha de ser replicado y transferido del progenitor a la célula hija en cada división celular. El modo por el cual la información genética es replicada y transmitida de célula a célula y de organismo a organismo representa pues una de las cuestiones centrales de la Biología. Así, la elucidación de los mecanismos de la transmisión genética y la identificación del ADN

como el material genético fueron descubrimientos que constituyen los c-
mientos de nuestro entendimiento actual de la biología a nivel molecul

Genes y cromosomas

Los principios genéticos clásicos fueron deducidos por Gregor Mendel en 1865, basándose en experimentos con guisantes. Mendel estudió la heren de un número de rasgos bien definidos, como el color de la semilla, y fue c-paz de deducir las reglas generales para su transmisión. Interpretó correc-mente los patrones de herencia observados asumiendo que cada rasgo es determinado por un par de factores heredados, conocidos actualmen como **genes**. De cada progenitor se hereda una copia del gen (llamada **alel** especificando cada rasgo. Por ejemplo, cruzando dos variedades de guisa-tes —una con semillas amarillas y otra con semillas verdes— se obtienen l siguientes resultados (Fig. 4.1): Las cepas progenitoras tienen cada una d copias idénticas del gen que especifica el color amarillo (*Y*) o verde (*y*) de las semillas, respectivamente. Las plantas hijas son por tanto híbridos, ha-biendo heredado un gen para semillas amarillas (*Y*) y otro para semill verdes (*y*). Todas estas plantas hijas (la primera generación o F_1) tiene sem-llas amarillas, por lo que se dice que el amarillo (*Y*) es **dominante** y el ver (*y*) **recesivo**. El **genotipo** (composición genética) de los guisantes F_1 es en-tonces *Yy*, y su **fenotipo** (apariencia física) es amarillo. Si se cruza un de-cendiente F_1 con otro, dando lugar a la generación F_2, los genes de las sem-llas amarillas y verdes se segregan de tal forma que la proporción entre plantas F_2 con semillas amarillas y aquellas con semillas verdes es 3:1.

Los descubrimientos de Mendel, aparentemente por delante de su tiem-po, fueron ignorados hasta 1900, cuando las leyes de Mendel fueron rede-cubiertas y se reconoció su importancia. Poco después se propuso el pape de los **cromosomas** como portadores de genes, al evidenciar que la mayo parte de las células de plantas superiores y animales son **diploides**, es dec contienen dos copias de cada cromosoma. Sin embargo, la formación de la células germinales (el espermatozoide y el óvulo) se produce a través de u tipo característico de división celular (**meiosis**) en el cual un único crom-

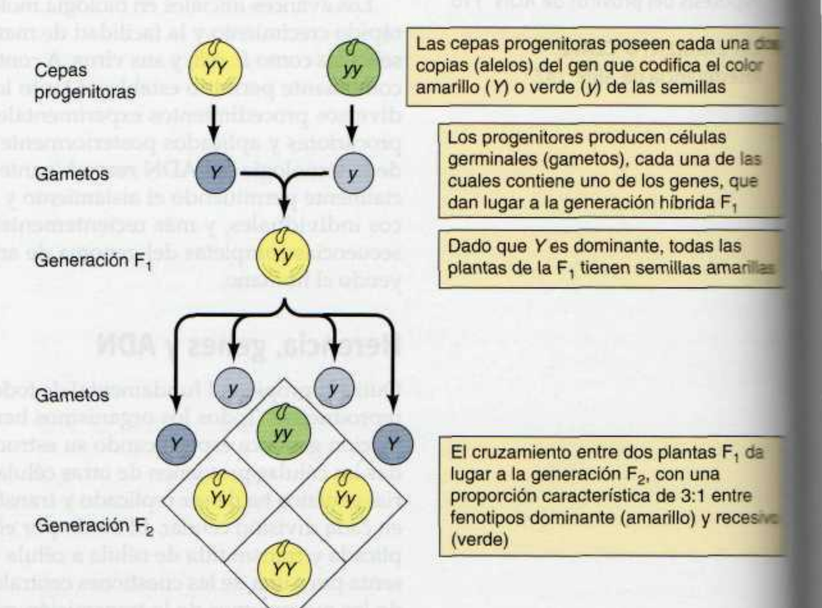


Figura 4.1 Herencia de genes dominantes y recesivos.

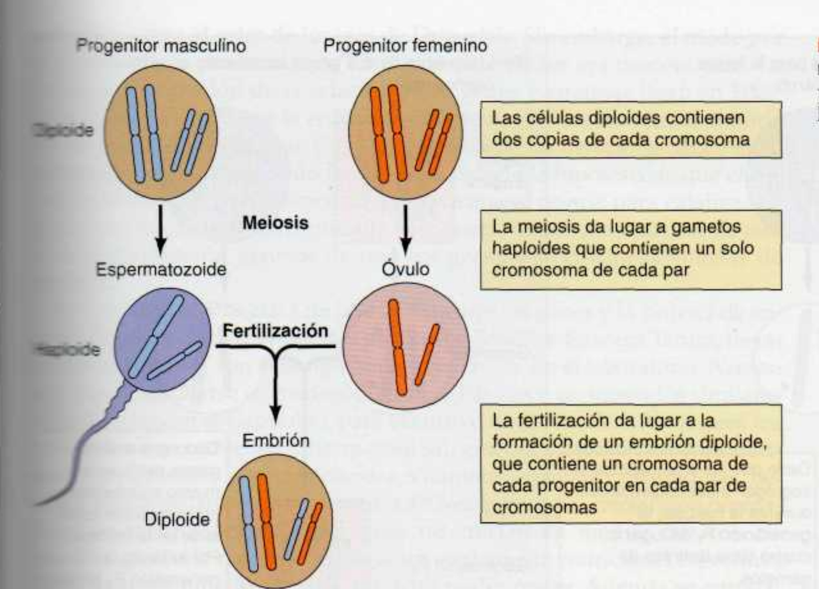


Figura 4.2 Cromosomas durante la meiosis y fertilización. Se ilustran dos pares de cromosomas de un organismo hipotético.

soma de cada par se transmite a cada célula hija (Fig. 4.2). Por lo tanto, el espermatozoide y el óvulo son **haploides**, dado que contiene una copia de cada cromosoma. La unión de estas dos células haploides en la fertilización da lugar a un nuevo organismo diploide, que contiene ahora un cromosoma de cada par procedente de cada progenitor, masculino y femenino. El comportamiento de los pares de cromosomas se asemeja al de los genes, llevando a la conclusión de que *los genes son transportados por los cromosomas*.

Los fundamentos de las mutaciones, ligamiento genético y las relaciones entre genes y cromosomas fueron en su mayor parte establecidos en experimentos con la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. *Drosophila* se mantiene con facilidad en el laboratorio, y se reproduce cada dos semanas, lo cual es una considerable ventaja para experimentos genéticos. De hecho, estas características siguen haciendo a *Drosophila* un organismo de elección para estudios genéticos en animales, particularmente en el análisis genético del desarrollo y la diferenciación.

A principios del siglo pasado se identificaron una serie de alteraciones genéticas (**mutaciones**) en *Drosophila*, afectando a características fácilmente observables como el color de los ojos o la forma de las alas. Los experimentos de cruzamiento indicaron que algunos de los genes responsables de estos rasgos se heredan de forma independiente entre ellos, sugiriendo que estos genes se localizan en diferentes cromosomas que se segregan independientemente durante la meiosis (Fig. 4.3). Otros genes, por otro lado, se heredan juntos como características emparejadas. Dichos genes se dice que están ligados entre sí en virtud de estar localizados en el mismo cromosoma. El número de grupos de genes ligados es el mismo que el número de cromosomas (cuatro en *Drosophila*), apoyando la idea de que los cromosomas son los portadores de los genes. En 1915, se habían definido y mapeado casi cien genes en cuatro cromosomas de *Drosophila*, dando lugar a una aceptación general de la base cromosómica de la herencia.

Genes y enzimas

Los estudios genéticos iniciales se centraron en la identificación y localización cromosómica de los genes que controlan características fácilmente ob-

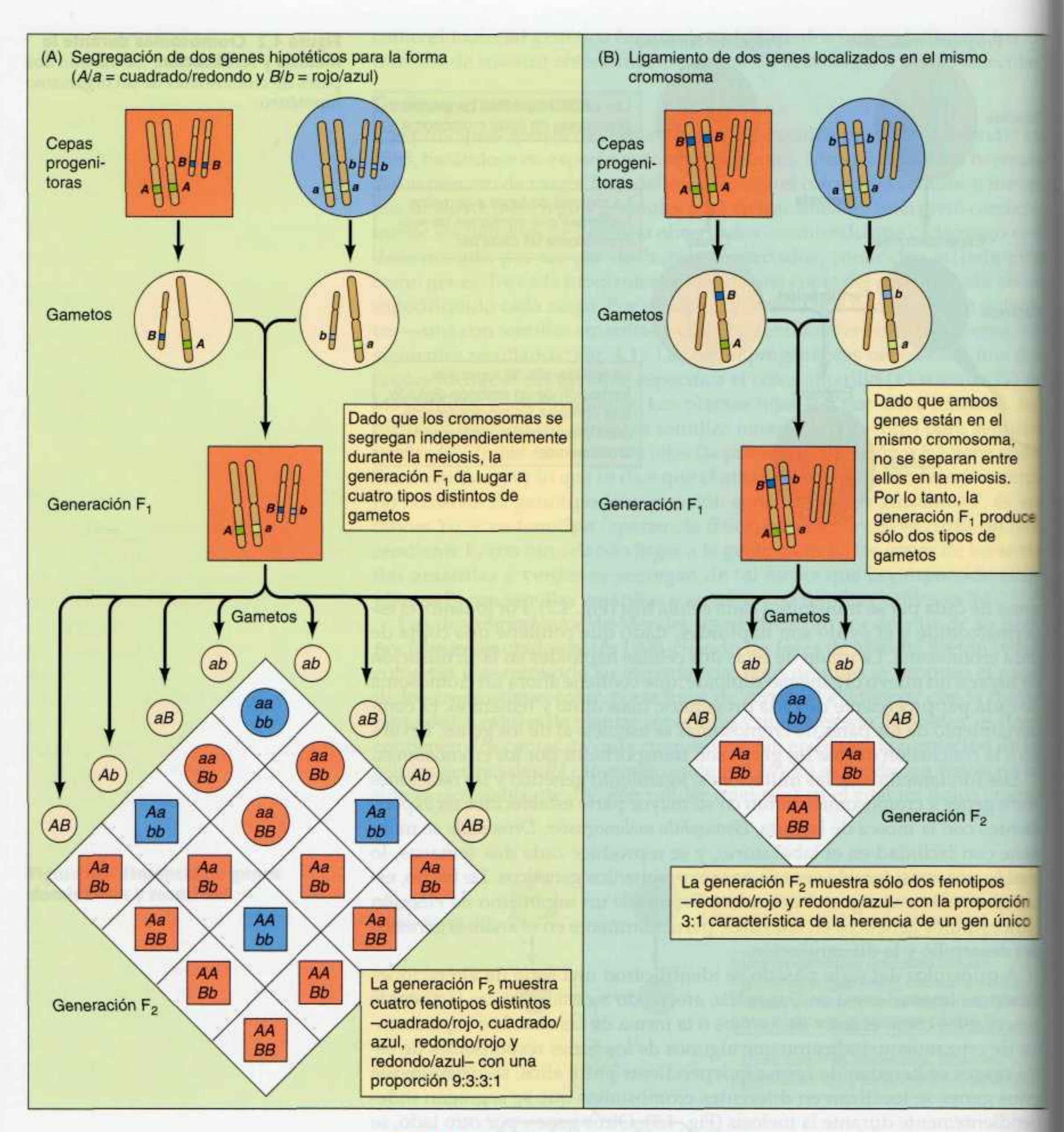


Figura 4.3 **Segregación y ligamento genético.**

servables, como el color de los ojos de *Drosophila*. Sin embargo, el modo por el que los genes producían los fenotipos observados era desconocido. La primera observación de la relación entre genes y enzimas llegó en 1909, cuando se evidenció que la enfermedad hereditaria humana fenilcetonuria (véase Medicina Molecular, Cap. 3) resultaba de un defecto genético en el metabolismo del aminoácido fenilalanina. Surgió la hipótesis de que el defecto aparecía por una deficiencia de la enzima necesaria para catalizar alguna reacción metabólica implicada en el metabolismo aminoácido, llevando a la presunción general de que los genes especifican la síntesis de enzimas.

Una evidencia más clara de la relación entre los genes y la síntesis de enzimas llegó con los experimentos de George Beadle y Edward Tatum, llevados a cabo en 1941 con el hongo *Neurospora crassa*. En el laboratorio, *Neurospora* puede cultivarse en medios de cultivo básicos o enriquecidos similares a los descritos en el Capítulo 1 para el cultivo de *E. coli*. Para *Neurospora* los medios básicos contienen únicamenste sal, glucosa y biotina; los enriquecidos se suplementan con aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Beadle y Tatum aislaron cepas mutantes de *Neurospora* que crecían con normalidad en medios enriquecidos pero no crecían en medios básicos. Se encontró que cada mutante requería un suplemento nutricional específico, como un determinado aminoácido, para poder crecer. Además se correlacionaba la necesidad de un determinado nutriente con la incapacidad de la cepa mutante para sintetizarlo. De este modo, cada mutación producía una deficiencia en una vía metabólica específica. Dado que se sabía que estas rutas metabólicas estaban compuestas de enzimas, la conclusión de estos experimentos fue que cada gen codificaba la síntesis de una enzima única —**la hipótesis un gen-una enzima**—. Actualmente se sabe que muchas enzimas se componen de varios polipéptidos, por lo que la afirmación aceptada en este momento es que cada gen codifica la estructura de una cadena polipeptídica.

Identificación del ADN como el material genético

El entendimiento de la base cromosómica de la herencia y la relación entre genes y enzimas no aportaron *per se* una explicación molecular del gen. Los cromosomas contienen proteínas además de ADN, y se creyó inicialmente que los genes eran proteínas. La primera evidencia que llevó a la identificación del ADN como el material genético llegó de estudios en bacterias. Estos experimentos representan el prototipo de los abordajes actuales para definir la función de los genes basados en la introducción de secuencias de ADN en las células, como será expuesto más adelante en este capítulo.

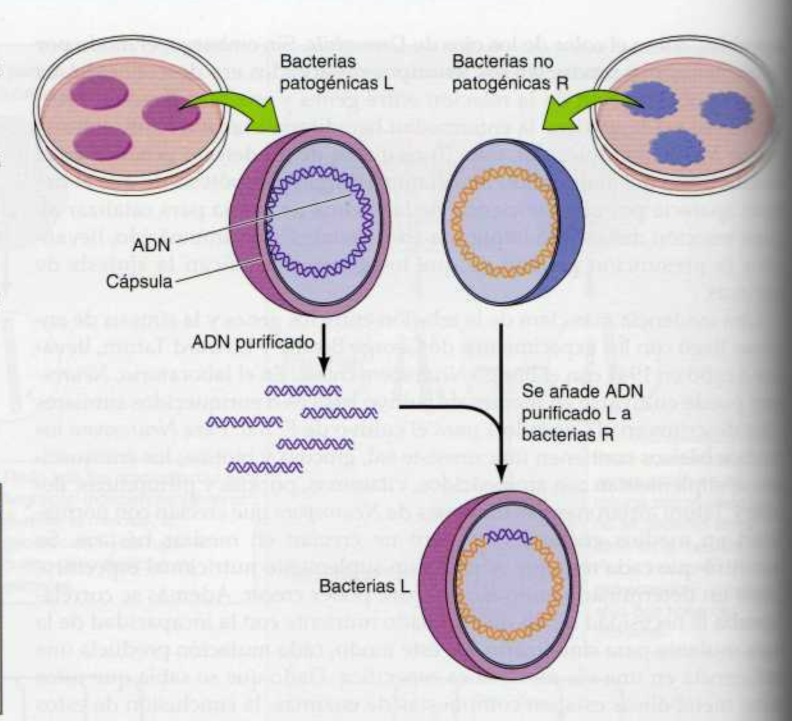
Los experimentos que definieron el papel del ADN se derivaron de estudios sobre la bacteria que causa la neumonía (*Pneumococcus*). Las cepas virulentas de *Pneumococcus* están rodeadas de una cápsula de polisacárido que protege a la bacteria del ataque del sistema inmune del huésped. Dado que la cápsula da a las colonias un aspecto liso en el medio de cultivo, las cepas encapsuladas se denominan L. Las cepas mutantes que han perdido la capacidad de sintetizar la cápsula (denominadas R) forman colonias con el borde rugoso y no son letales cuando se inoculan en el ratón. En 1928 se observó que los ratones inoculados con bacterias no encapsuladas (R) y bacterias encapsuladas (S) inactivadas con calor desarrollaron neumonía y murieron. Conviene reseñar que las bacterias aisladas en estos ratones eran del tipo S. Experimentos posteriores mostraron que un extracto de bacterias de tipo S libre de células era igualmente capaz de convertir (o transformar) bacterias R al estado S. Por lo tanto, una sustancia en el extracto S (llamado el principio transformador o transformante) era responsable de inducir la **transformación** genética de bacteria R a S.

4.1 Animación web

Avery, MacLeod y McCarty

A través de una serie de experimentos en 1944, Oswald Avery, Colin MacLeod, y Maclyn McCarty establecieron que el principio transformante (material genético) es el ADN.

Figura 4.4 Transferencia de información genética por el ADN. Se extrae el ADN de una cepa patogénica de *Pneumococcus*, rodeado de una cápsula y que forma colonias lisas (L). Si se añade este ADN purificado L a un cultivo de *Pneumococcus* no patogénicos, que no forman cápsula y que forman colonias rugosas (R), se transforman a la forma L. Por lo tanto, el ADN purificado contiene la información genética responsable de la transformación de bacterias R en L.



4.2 Animación web

Transformación bacteriana

Una cepa no patogénica de *Pneumococcus* puede ser transformada en una cepa patogénica mediante la incorporación de fragmentos de ADN procedentes de una cepa patogénica y de su incorporación en su cromosoma.

En 1944 Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty establecie
de forma doble que el principio transformador era ADN, purificándolo
extractos bacterianos y demostrando que su actividad desaparece tras la d
gestión enzimática del ADN y no tras la digestión enzimática de las prot
nas (Fig. 4.4). Pese a que estos estudios no llevaron a la aceptación inmedi
ta del ADN como el material genético, fueron ampliados unos pocos a
después con experimentos con virus bacterianos. En particular, se obser
que cuando un virus infectaba a una célula era preciso que el ADN viral p
netrara en la célula (pero no las proteínas) para que el virus se replica
Además, a las partículas virales hijas se transmite el ADN del virus prog
nitor y no sus proteínas. La concurrencia de estos resultados junto con est
dios posteriores de la actividad del ADN en la transformación bacteria
llevó a la aceptación de la idea de que el ADN es el material genético.

Estructura del ADN

La comprensión de la estructura tridimensional del ADN, deducida en 19
por James Watson y Francis Crick, ha sido la base para la biología molecu
actual. En la época de los trabajos de Watson y Crick se sabía que el AD
era un polímero compuesto de cuatro nucleótidos —dos purinas (aden
[A] y guanina [G]) y dos pirimidinas (citosina [C] y timina [T])— unidas
azúcares fosforilados. Dado el papel central del ADN como material gen
co, la elucidación de su estructura tridimensional parecía crítica para ent
der su función. El enfoque de Watson y Crick del problema estuvo muy i
fluenciado por la descripción de Linus Pauling de las uniones por puen
de hidrógeno y la α-hélice, un tipo común de estructura secundaria de l
proteínas (véase el Cap. 2). Se obtuvo además información experimental s
bre la estructura del ADN con los estudios de cristalografía por refracci
de rayos X llevados a cabo por Maurice Wilkins y Rosalind Franklin. E
análisis de estos datos reveló que el ADN es una hélice que da un gi

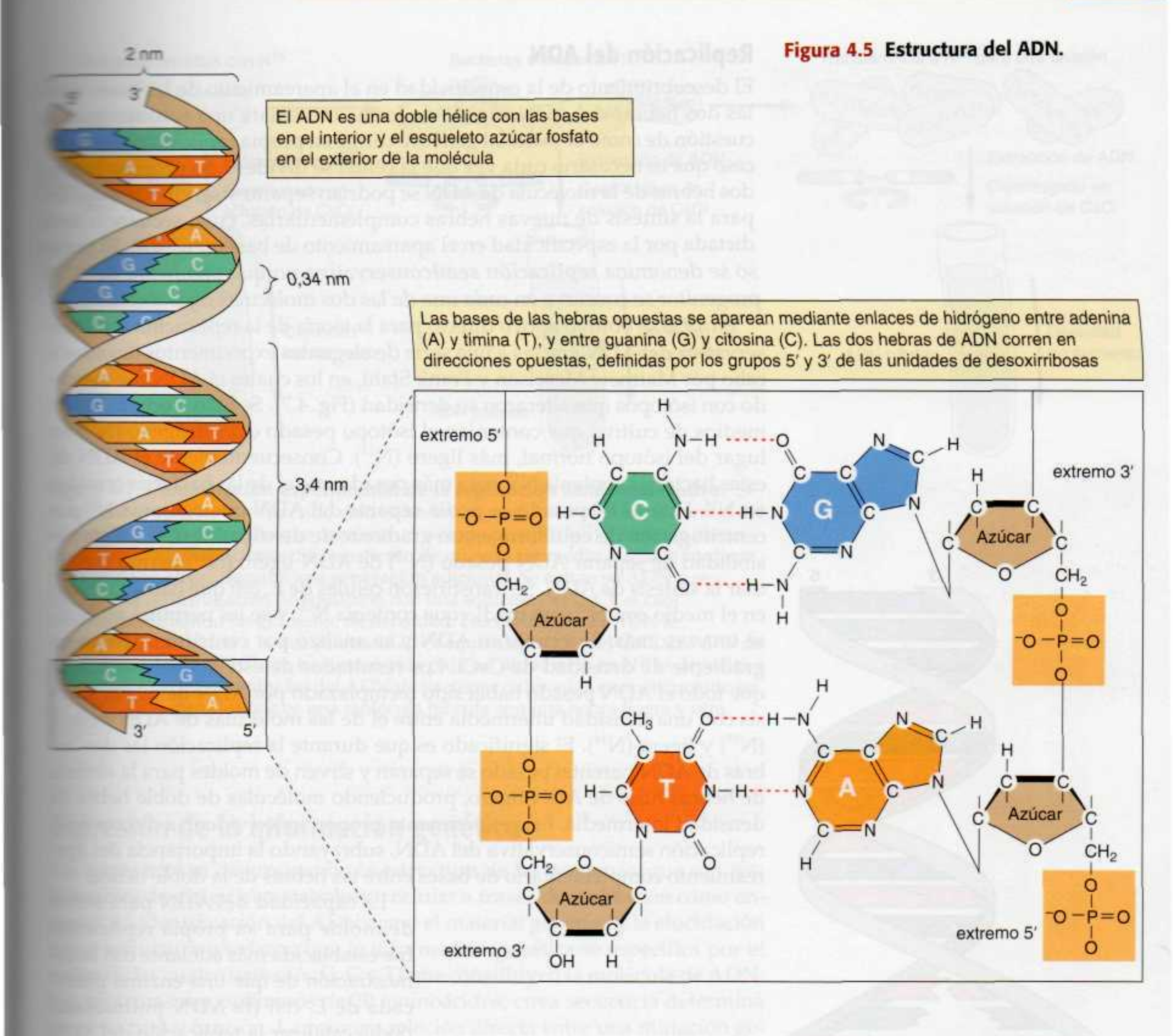


Figura 4.5 Estructura del ADN.

cada 3,4 nm, y que la distancia entre bases es de 0,34 nm, por lo que en cada vuelta de la hélice hay diez bases. Un dato importante es que el diámetro de la hélice es de 2 nm, sugiriendo que está compuesto no de una sino de dos cadenas de ADN.

A partir de estos datos Watson y Crick construyeron su modelo del ADN (Fig. 4.5). La principal característica es que se trata de una doble hélice con el esqueleto azúcar-fosfato en el exterior de la molécula. Las bases están en el interior, orientadas de tal forma que se forman enlaces de hidrógeno entre purinas y pirimidinas de cadenas opuestas. El apareamiento de las bases es muy específico: A siempre se empareja con T y G con C. Esta especificidad explica los resultados previos de Erwin Chargaff, quien analizó la composición de diversos ADN y encontró que la cantidad de adenina era siempre equivalente a la de timina, y la cantidad de citosina a la de guanina. A causa de esta especificidad en el apareamiento de bases las dos hebras de ADN son complementarias: cada hebra contiene toda la información necesaria para especificar la secuencia de bases de la otra.

La estructura del ADN descrita por Watson y Crick fue un notable logro, pero no perfecto. En su publicación inicial, asumieron que tanto A-T como G-C estaban asociados mediante dos puentes de hidrógeno, no percatándose del tercer puente de hidrógeno en los pares G-C.

Replicación del ADN

El descubrimiento de la especificidad en el apareamiento de las bases entre las dos hebras del ADN sugirió de forma inmediata una solución para la cuestión de cómo el material genético dirige su propia replicación —un proceso que es necesario cada vez que la célula se divide—. Se propuso que las dos hebras de la molécula de ADN se podrían separar y servir como moldes para la síntesis de nuevas hebras complementarias, cuya secuencia sería dictada por la especificidad en el apareamiento de bases (Fig. 4.6). El proceso se denomina **replicación semiconservativa** porque una hebra de ADN progenitor se conserva en cada una de las dos moléculas hijas de ADN.

En 1958 se obtuvo apoyo directo para la teoría de la replicación semiconservativa del ADN gracias a una serie de elegantes experimentos llevados a cabo por Matthew Meselson y Frank Stahl, en los cuales el ADN fue marcado con isótopos que alteraron su densidad (Fig. 4.7). Se hizo crecer *E. coli* en medios de cultivo que contenían el isótopo pesado del nitrógeno (N^{15}) en lugar del isótopo normal, más ligero (N^{14}). Consecuentemente el ADN de estas bacterias contenía N^{15} y era más pesado que el de las bacterias crecidas en N^{14}. Este ADN pesado se podía separar del ADN que contenía N^{14} por centrifugación de equilibrio en un gradiente de densidad de CsCl. Esta posibilidad de separar ADN pesado (N^{15}) de ADN ligero (N^{14}) permitió estudiar la síntesis de ADN. Se transfirieron células de *E. coli* que habían crecido en el medio con N^{15} a un medio que contenía N^{14}, y se les permitió replicarse una vez más. Se extrajo su ADN y se analizó por centrifugación en un gradiente de densidad de CsCl. Los resultados de este análisis indicaron que todo el ADN pesado había sido reemplazado por ADN de nueva síntesis con una densidad intermedia entre el de las moléculas de ADN pesado (N^{15}) y ligera (N^{14}). El significado es que durante la replicación las dos hebras de ADN parental pesado se separan y sirven de moldes para la síntesis de hebras hijas de ADN ligero, produciendo moléculas de doble hebra de densidad intermedia. Este experimento proporcionó evidencia directa de la replicación semiconservativa del ADN, subrayando la importancia del apareamiento complementario de bases entre las hebras de la doble hélice.

La capacidad del ADN para servir de molde para su propia replicación fue establecida más adelante con la demostración de que una enzima purificada de *E. coli* (la **ADN polimerasa**) podía catalizar la replicación del ADN *in vitro*. Con la presencia de ADN como molde, la ADN polimerasa era capaz de dirigir la incorporación de nucleótidos en una molécula del ADN complementaria.

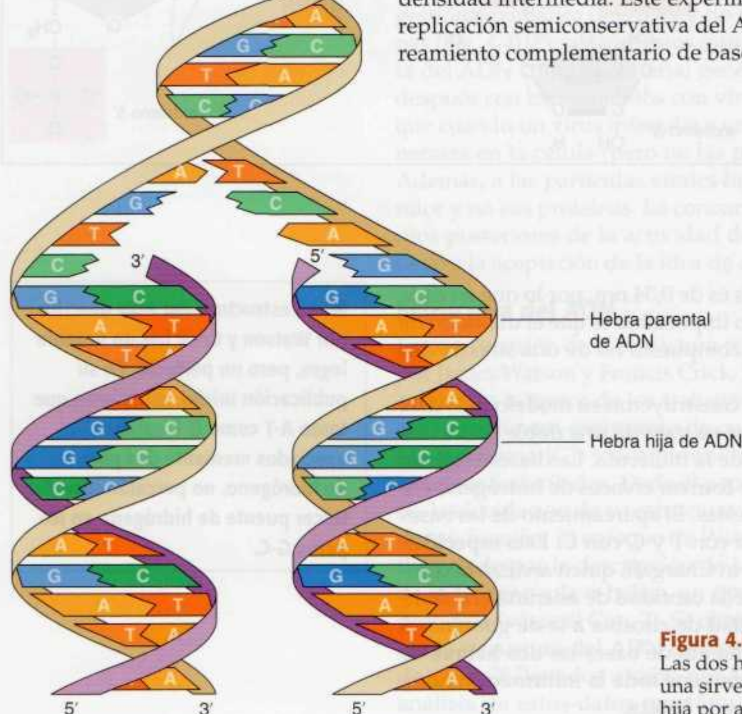


Figura 4.6 Replicación semiconservativa del ADN. Las dos hebras de ADN parental se separan, y cada una sirve como molde para la síntesis de una hebra hija por apareamiento complementario de bases.

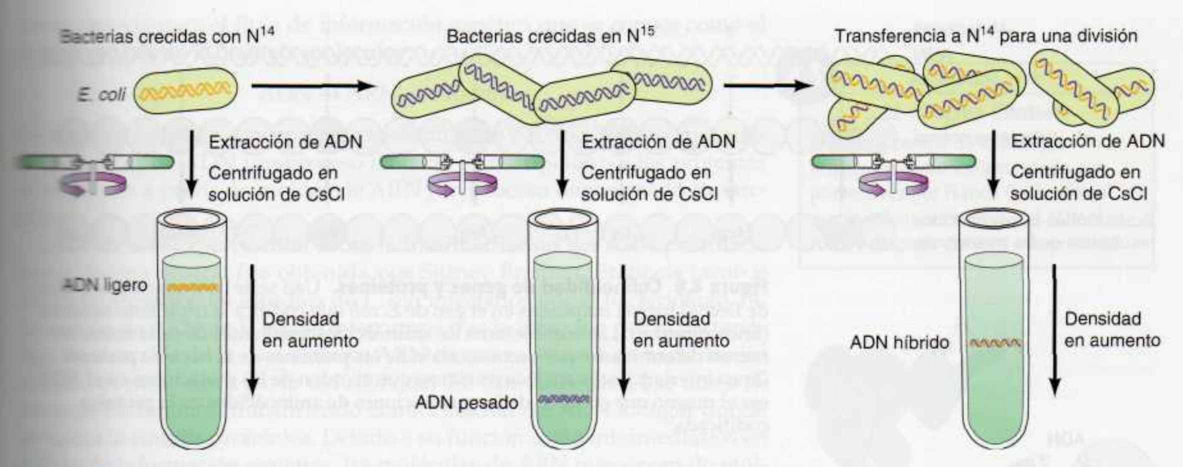


Figura 4.7 Demostración experimental de la replicación semiconservativa. Se transfieren bacterias que han sido cultivadas en un medio con el isótopo normal del nitrógeno (N^{14}) a un medio que contiene un isótopo pesado (N^{15}) y se dejan crecer durante varias generaciones. Se transfieren de nuevo a un medio que sólo contiene N^{14} y se dejan crecer durante una generación adicional. Se extrae su ADN y se analiza por centrifugación de equilibrio con una solución del CsCl, el cual sedimenta formando un gradiente de densidad. Las moléculas de ADN se depositan a una altura a la que su densidad es equivalente a la del CsCl. El ADN de la bacteria crecida en N^{15} que fue transferida para un único ciclo en N^{14} se deposita a una altura intermedia entre las del ADN de bacterias cultivadas exclusivamente en N^{14} y N^{15}. Esto significa que es una molécula híbrida con una hebra ligera y otra pesada.

Expresión de la información genética

Los genes actúan determinando la estructura de las proteínas, que son responsables de dirigir el metabolismo celular a través de su función como enzimas. La identificación del ADN como el material genético y la elucidación de su estructura revelaron que la información genética se especifica por el orden de las cuatro bases (A, C, G y T) que constituyen la molécula de ADN. Las proteínas son polímeros de 20 aminoácidos, cuya secuencia determina su estructura y función. La primera relación directa entre una mutación genética y una alteración en la secuencia de aminoácidos de una proteína se estableció en 1957, cuando se descubrió que los pacientes con una enfermedad hereditaria denominada anemia de células falciformes poseen moléculas de hemoglobina que difieren de las normales en una sola sustitución de un aminoácido. Se obtuvo un entendimiento más profundo de la relación molecular entre ADN y proteínas tras una serie de experimentos que tomaron como modelos genéticos a *E. coli* y sus virus.

Colinealidad de genes y proteínas

La hipótesis más simple para entender la relación entre genes y enzimas era que el orden de los nucleótidos en el ADN especificaba el orden de aminoácidos en la proteína. Las mutaciones en un gen se corresponderían con alteraciones en la secuencia de ADN, que resultarían de la sustitución de un nucleótido por otro o de la adición o delección de nucleótidos. Estos cambios en la secuencia de nucleótidos producirían los cambios correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen en cuestión. Esta hipótesis predecía que distintas mutaciones en el mismo gen alterarían distintos aminoácidos en la proteína codificada, y que las posiciones

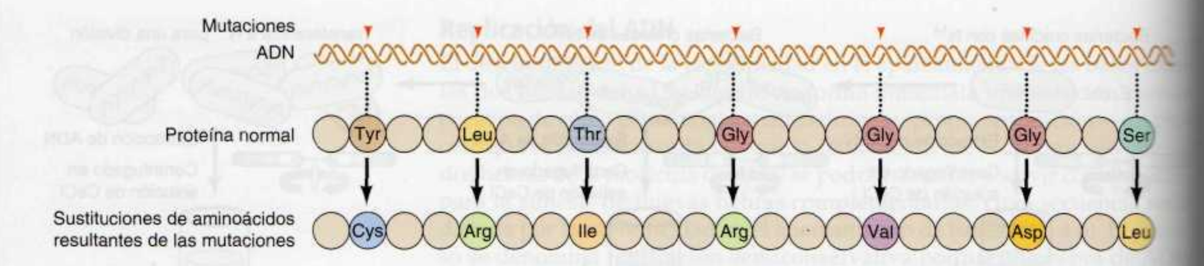


Figura 4.8 Colinealidad de genes y proteínas. Una serie de mutaciones (puntas de flecha) fueron mapeadas en el gen de *E. coli* que codifica la triptófano sintetasa (línea superior). Las sustituciones de aminoácidos resultantes de cada mutación fueron determinadas por secuenciación de las proteínas de la bacteria mutante (línea inferior). Estos análisis revelaron que el orden de las mutaciones en el ADN era el mismo que el orden de las sustituciones de aminoácidos en la proteína codificada.

Figura 4.9 Síntesis de ARN a partir de ADN. Las dos hebras de ADN se desenrollan, y una es usada como molde para la síntesis de una hebra de ARN.

de las mutaciones en un gen se reflejarían en las posiciones de las alteraciones en los aminoácidos a lo largo de su producto proteínico.

La rapidez de replicación y la simplicidad del sistema genético de *E. coli* fueron de gran ayuda para abordar estas cuestiones. Se pueden aislar una gran variedad de mutantes, incluidas mutaciones nutricionales que de igual modo que las mutaciones de *Neurospora* discutidas previamente requieren determinados aminoácidos para crecer. El rápido crecimiento de *E. coli* hizo posible el aislamiento y mapeo de mutaciones múltiples en el mismo gen, llevando a la primera demostración de la relación lineal entre genes y proteínas. En estos estudios Charles Yanofsky y sus colaboradores mapearon una serie de mutaciones en el gen que codifica una enzima necesaria para la síntesis del aminoácido triptófano. El análisis de las enzimas codificadas por los genes mutantes reveló que las posiciones relativas de los aminoácidos alterados eran las mismas que las de las mutaciones correspondientes (Fig. 4.8). Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos en la proteína es colineal con la de mutaciones en el gen, como es de esperar si el orden de nucleótidos en el ADN especifica el orden de aminoácidos en la proteína.

Papel del ARN mensajero

Aunque la secuencia de nucleótidos en el ADN parecía especificar el orden de los aminoácidos en las proteínas, eso no significaba necesariamente que el ADN dirigiera por sí mismo la síntesis de proteínas. De hecho, no parecía ser el caso, dado que el ADN se localiza en el núcleo de las células eucariotas, mientras que la síntesis proteínica se lleva a cabo en el citoplasma. Era necesaria otra molécula para llevar la información genética del ADN a los sitios donde se realiza la síntesis de proteínas (los ribosomas).

El ARN se antojaba un buen candidato para ser dicho intermediario porque la similitud de su estructura con la del ADN sugería que el ARN podía ser sintetizado a partir de un molde de ADN (Fig. 4.9). El ARN difiere del ADN en que se compone de una cadena única en vez de ser de doble cadena, sus azúcares son ribosas en vez de desoxirribosas y contiene la base pirimidínica uracilo (U) en vez de timina (T) (véase Fig. 2.10). Sin embargo, ni el cambio de azúcar ni la sustitución de U por T altera el apareamiento de las bases, por lo que la síntesis de ARN puede ser realizada de manera directa sobre un molde de ADN. Además, dado que el ARN se localiza primariamente en el citoplasma, parecía un intermediario lógico para transferir la información del ADN a los ribosomas. Estas características del ARN su-

ron una vía para el flujo de información genética que se conoce como el **dogma central** de la biología molecular:

ADN → ARN → Proteína

De acuerdo con este concepto, las moléculas de ARN se sintetizan a partir de moldes de ADN (un proceso llamado **transcripción**), y las proteínas se sintetizan a partir de moldes de ARN (un proceso denominado **traducción**).

La evidencia experimental sobre la intermediación del ARN postulada por el dogma central fue obtenida por Sidney Brenner, François Jacob y Matthew Meselson en estudios de *E. coli* infectados por el bacteriófago T4. La síntesis de ARN de *E. coli* se interrumpe tras la infección por el bacteriófago T4, después de lo cual el único ARN de nueva síntesis en bacterias infectadas es transcrito a partir del ADN del T4. Este ARN del T4 se une a ribosomas bacterianos, transfiriendo la información del ADN al lugar donde se realiza la síntesis proteínica. Debido a su función como intermediarios en el flujo de información genética, las moléculas de ARN que sirven de moldes para la síntesis proteínica se denominan **ARN mensajeros** (**ARNm**). Son transcritos por una enzima (**ARN polimerasa**) que cataliza la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN.

Aparte del ARNm, existen otros dos tipos de moléculas de ARN que son importantes en la síntesis proteínica. El **ARN ribosómico** (**ARNr**) es un componente de los ribosomas, y el **ARN de transferencia** (**ARNt**) funciona como una molécula adaptadora que alinea los aminoácidos a lo largo del molde de ARNm. La estructura y función de estas moléculas se tratan en la siguiente sección y en mayor detalle en los Capítulos 7 y 8.

Código genético

¿Cómo se traduce la secuencia de nucleótidos del ARNm a la secuencia de aminoácidos de una proteína? En este escalón de la expresión génica se transfiere información genética entre macromoléculas químicamente no relacionadas —ácidos nucleicos y proteínas— y plantea dos nuevos problemas para entender la acción de los genes.

Primero, dado que los aminoácidos no se relacionan estructuralmente con las bases de los ácidos nucleicos, el apareamiento complementario directo entre las bases del ARNm y los aminoácidos durante la incorporación de éstos a las proteínas parecía imposible. ¿Cómo se alineaban entonces los aminoácidos sobre el molde de ARNm durante la síntesis proteínica? Esta cuestión se aclaró con el descubrimiento de que los ARNt sirven de adaptadores entre los aminoácidos y el ARNm durante la traducción (Fig. 4.10). Previamente a su utilización en la síntesis proteínica, cada aminoácido se une a su ARNt por medio de una enzima específica. El apareamiento de bases entre una secuencia de reconocimiento del ARNt y una secuencia complementaria en el ARNm dirige al aminoácido a su posición correcta en el molde de ARNm.

El segundo problema para traducir una secuencia de nucleótidos a una secuencia de aminoácidos era la determinación del **código genético**. ¿Cómo se podría transferir la información contenida en una secuencia nucleotídica de cuatro elementos a la secuencia de 20 aminoácidos distintos que compone las proteínas? Dado que cuatro nucleótidos deben codificar 20 aminoácidos, son precisos al menos tres nucleótidos para codificar cada aminoácido. Tomados individualmente, los cuatro nucleótidos sólo pueden codificar cuatro aminoácidos, y tomados en parejas cuatro nucleótidos sólo codifican dieciséis (4^2) aminoácidos. Sin embargo, tomados de tres en tres cuatro nucleótidos podrían codificar 64 (4^3) aminoácidos distintos —más que suficiente para los 20 aminoácidos existentes en las proteínas.

4.3 **Animación web**

El «Dogma Central»

El dogma central de la biología molecular, como fue enunciado por primera vez por Francis Crick, afirma que la información fluye del ADN al ARN, y después del ARN a la proteína.

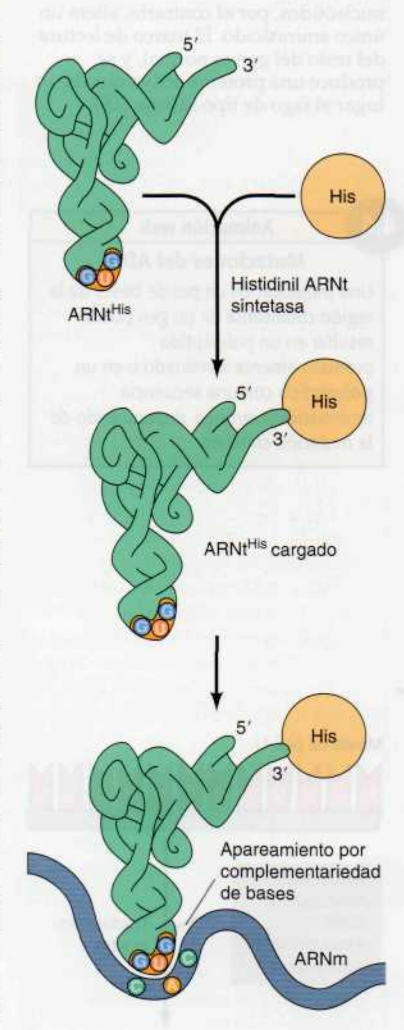


Figura 4.10 Función del ARN de transferencia. El ARN de transferencia sirve como un adaptador durante la síntesis proteica. Cada aminoácido (p. ej., histidina) se une al extremo 3′ de un RNAt por una enzima apropiada (una aminoacil RNAt sintetasa). El RNAt cargado se alinea sobre un molde de RNAm por complementariedad de bases.

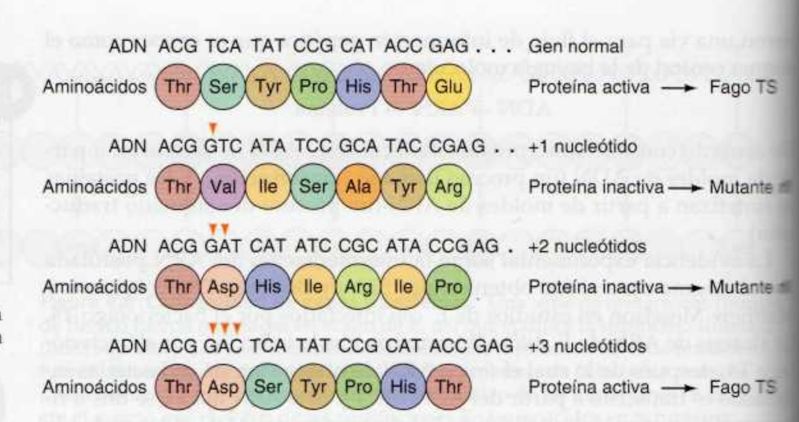


Figura 4.11 Evidencia genética del código de tripletes. Fueron estudiadas una serie de mutaciones que consistían en la adición de uno, dos o tres nucleótidos en el gen *rII* del bacteriófago T4. La adición de uno o dos nucleótidos altera el marco de lectura de todo el resto del gen. Por lo tanto, todos los aminoácidos son anormales y se produce una proteína inactiva, dando lugar a un fago mutante. La adición de tres nucleótidos, por el contrario, altera un único aminoácido. El marco de lectura del resto del gen es normal, y se produce una proteína activa que da lugar al fago de tipo salvaje (TS).

> **4.4 Animación web**
>
> **Mutaciones del ADN**
>
> Una mutación en un par de bases de la región codificante de un gen puede resultar en un polipéptido prematuramente terminado o en un polipéptido con una secuencia aminoacídica errónea, dependiendo de la mutación concreta.

La evidencia experimental directa se obtuvo en estudios con el bacteriófago T4, portador de mutaciones en un gen conocido detalladamente, llamado *rII*. Los fagos con mutaciones en este gen forman placas anormalmente grandes, que son fácilmente distinguibles de las formadas por fagos del tipo salvaje. Por lo tanto, fue sencillo aislar y mapear un cierto número de estas mutaciones en el *rII*, lo cual llevó al establecimiento de un detallado mapa genético de este *locus*. El estudio de las recombinaciones entre mutantes del gen *rII* que surgieron por adiciones o deleciones de nucleótidos reveló que los fagos que contenían adiciones o deleciones de uno o dos nucleótidos siempre mostraban el fenotipo mutante. Sin embargo, los fagos que contenían adiciones o deleciones de tres nucleótidos eran funcionalmente del tipo salvaje (Fig. 4.11). Estos hallazgos sugirieron que el gen se lee en grupos de tres nucleótidos, empezando a partir de un punto fijo. Adiciones o deleciones de uno o dos nucleótidos alterarían el marco de lectura de todo el gen, llevando a la codificación de aminoácidos anormales a lo largo de toda la proteína. Por el contrario, la adición o deleción de tres nucleótidos lleva a la adición o deleción de un solo aminoácido; el resto de la secuencia aminoacídica permanece inalterada, produciendo frecuentemente una proteína activa.

El desciframiento del código genético se convirtió en un problema de asignar tripletes de nucleótidos a sus correspondientes aminoácidos. La aproximación al problema consistió en el uso de sistemas *in vitro* que realizaran síntesis proteínica (**traducción *in vitro***). Se sabía que los extractos celulares que contienen ribosomas, aminoácidos, ARNt y las enzimas responsables de unir a los aminoácidos con su correspondiente ARNt (aminoacil-ARNt sintetasas) son capaces de catalizar la incorporación de aminoácidos a las proteínas. Esta síntesis proteínica depende de la presencia de ARNm unido a los ribosomas, y se puede aumentar añadiendo ARNm purificado. Dado que el ARNm dirige la síntesis proteínica en estos sistemas, el código genético podría ser descodificado estudiando la traducción de ARNm sintético de secuencia conocida.

El primero de dichos experimentos, llevado a cabo por Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei, consistió en la traducción *in vitro* de un polímero de ARN que únicamente contenía uracilo (Fig. 4.12). Este molde de poli-U dirigió la incorporación de un único aminoácido —fenilalanina— en un polipéptido formado por residuos repetidos de fenilalanina. Por tanto, el triplete UUU codifica el aminoácido fenilalanina. Experimentos similares con polímeros de ARN compuestos de un único nucleótido establecieron que AAA codifica la lisina y CCC codifica la prolina. El resto del código fue descifrado utilizando polímeros de ARN compuestos de mezclas de nucleó-

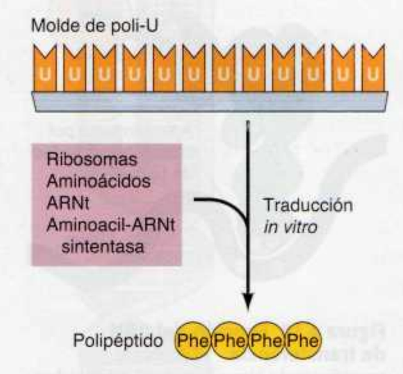


Figura 4.12 El triplete UUU codifica a la fenilalanina. La traducción *in vitro* de un ARN sintético compuesto de uracilos repetidos (un molde de poli-U) lleva a la síntesis de un polipéptido compuesto únicamente por fenilalanina.

Tabla 4.1 El código genético

Primera posición	Segunda posición U	C	A	G	Tercera posición
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	stop	stop	A
	Leu	Ser	stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

dos, llevando a la asignación de los 64 posibles tripletes (denominados **codones**) (Tabla 4.1). De los 64 codones, 61 codifican algún aminoácido; los tres restantes (UAA, UAG y UGA) son codones de parada o *stop* que señalizan la terminación de la síntesis proteínica. El código está degenerado, dado que muchos aminoácidos están codificados por más de un codón. Con pocas excepciones (discutidas en el Cap. 11), todos los organismos utilizan el mismo código genético, apoyando con fuerza la conclusión de que todas las células actuales han evolucionado a partir de un ancestro común.

Virus ARN y transcripción inversa

Con el esclarecimiento del código genético, los principios fundamentales de la biología molecular celular parecían estar establecidos. De acuerdo con el dogma central, el material genético es el ADN, que es capaz de autorreplicarse además de transcribirse a ARNm, que sirve a su vez de molde para la síntesis proteínica. Sin embargo, como fue expuesto en el Capítulo 1, muchos virus contienen ARN en vez de ADN como material genético, lo cual implica la existencia de otros modos de transferencia de información.

Los genomas de ARN fueron descubiertos en primer lugar en virus vegetales, muchos de los cuales se componen únicamente de ARN y proteínas. En los años 50 se obtuvo evidencia directa de que el ARN actúa como material genético por medio de experimentos que demostraron que el ARN purificado del virus del mosaico del tabaco podía infectar nuevas células, dando lugar a una progenie de virus infectivos. El modo de replicación de la mayoría de los genomas virales ARN se determinó posteriormente en estudios de los bacteriófagos ARN de *E. coli*. Estos virus codifican una enzima específica que cataliza la síntesis de ARN a partir de un molde de ARN (síntesis de ARN dirigida por ARN), utilizando el mismo mecanismo de apareamiento de bases entre hebras complementarias que se da durante la replicación del ADN o durante la transcripción de ARN a partir de ADN.

Aunque la mayoría de los virus animales, como el poliovirus o el virus influenza, se observó que se replicaban por síntesis de ARN dirigida por



EXPERIMENTO CLAVE

Hipótesis del provirus de ADN

Naturaleza del provirus del sarcoma de Rous
Howard M. Temin
Laboratorio McArdle, Universidad de Wisconsin, Madison, WI
Monográficos del National Cancer Institute. Volumen 17, 1964, págs. 557-570


Howard M. Temin

Contexto

El virus del sarcoma de Rous (VSR), el primer virus inductor de cáncer descrito, era de considerable interés como sistema experimental para el estudio de la biología molecular del cáncer. Howard Temin comenzó su investigación en esta área cuando, como estudiante de graduado en 1958, desarrolló el primer método para la transformación de células normales en células cancerosas tras su infección por el VSR. La disponibilidad de un método cuantitativo *in vitro* proporcionó la herramienta necesaria para estudios posteriores de transformación celular y replicación viral. Mientras Temin realizaba dichos estudios, realizó una serie de inesperadas observaciones que indicaron que la replicación de VSR era básicamente distinta de la del resto del virus ARN. Estos experimentos llevaron a Temin a proponer la hipótesis del provirus de ADN, que afirmaba que el ARN viral se copiaba a ADN en las células infectadas —una propuesta que iba directamente en contra del universalmente aceptado dogma central de la biología molecular.

Experimentos

La hipótesis del provirus de ADN se basaba en evidencia experimental de diversas fuentes. En primer lugar, los estudios de transformación celular utilizando mutantes de VSR indicaron que la información genética del virus determinaba importantes características en las células hijas tras cada división, incluso en ausencia de replicación viral. Temin propuso que el genoma viral estaba presente en las células infectadas en una forma estable y heredable, que denominó provirus.

La evidencia de que el provirus se compone de ADN se derivó de experimentos con inhibidores metabólicos. La actinomicina D, que inhibe la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN, inhibía la producción de virus en células infectadas por el VSR (véase figura). Por otro lado, los inhibidores de la síntesis de ADN inhibían estadios precoces de la infección celular por VSR. Esto puso de manifiesto que se requería síntesis de ADN al principio de la infección y síntesis de ARN dirigida por ADN para producir virus hijos, lo cual llevó a la propuesta de que el provirus era una copia de ADN del genoma ARN viral. Temin trató de aportar más evidencia utilizando hibridación de ácidos nucleicos para detectar secuencias virales en el ADN de células infectadas, pero la sensibilidad de las técnicas disponibles era limitada y los datos no fueron convincentes.

Impacto

La hipótesis del provirus de ADN se propuso basándose en experimentos genéticos y en los efectos de inhibidores metabólicos. Era una

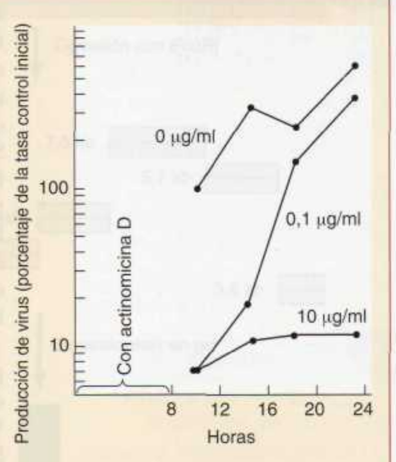
4.5 **Animación web**
Reproducción del VIH
Como parte de un ciclo de replicación en el interior de una célula hospedadora, un retrovirus emplea la enzima transcriptasa inversa para copiar su genoma ARN en ADN.

ARN, este mecanismo no parecía explicar la replicación de una familia de virus animales (los virus ARN tumorigénicos), que eran de especial inte- debido a su capacidad de causar cáncer en animales infectados. Pese a q- estos virus contienen ARN genómico en las partículas virales, los expe- mentos llevados a cabo por Howard Temin en los años 60 indicaron que s- requería síntesis de ADN en las células infectadas para completar su ci- vital, llevando a la hipótesis de que los virus tumorales de ARN (deno- nados actualmente **retrovirus**) se replicaban por medio de la síntesis de u- ADN intermediario, llamado provirus de ADN (Fig. 4.13). Esta hipóte- fue recibida inicialmente con incredulidad generalizada dado que impl- la síntesis de ADN dirigida por ARN —una inversión del dogma central d- la biología molecular—. Sin embargo, en 1970 Howard Temin y David Ba- timore descubrieron de forma independiente que el ARN de los virus t- morales contenía una enzima que cataliza la síntesis de ADN desde un m- de de ARN. Adicionalmente se obtuvo evidencia fehaciente de la existen- de secuencias de ADN viral en las células infectadas. La síntesis de AD-

EXPERIMENTO CLAVE

propuesta radical que contradecía el aceptado dogma central de la biología molecular. En este contexto, la hipótesis de Temin de que el VSR se replicaba transfiriendo su información de ARN a ADN no sólo no fue aceptada por la comunidad científica, sino que fue recibida con sorna generalizada. Sin embargo, Temin continuó durante los años 60 sus experimentos tratando de aportar una evidencia más convincente para su hipótesis. Sus esfuerzos culminaron en 1970 con el descubrimiento por Temin y Satoshi Mizutani, e independientemente por David Baltimore, de una enzima viral, conocida ahora como transcriptasa inversa, que sintetiza ADN a partir de un molde de ARN —una demostración bioquímica inequívoca de que el dogma central podía invertirse.

Temin concluyó su artículo de 1970 con la afirmación de que los resultados «constituyen una fuerte evidencia de que la hipótesis del provirus de ADN es correcta y que los virus tumorales de ARN tienen un genoma de ADN cuando están dentro de las células y un genoma de ARN cuando están en forma de viriones. Estos resultado pueden tener importantes implicaciones en la carcinogénesis de origen viral y posiblemente en los modelos de transferencia de información en otros sistemas biológicos». Como predijo Temin, el descubrimiento de la síntesis de ADN dirigida por ARN ha llevado a importantes avances en el entendimiento del cáncer, los retrovirus humanos y el reordenamiento genético. La transcriptasa inversa se ha convetido en una herramienta crítica para clonar el ADN, repercutiendo en virtualmente todas las áreas de la biología celular y molecular contemporánea.



Efecto de la actinomicina D sobre la replicación del RSV. Las células infectadas con RSV fueron cultivadas con las concentraciones indicadas de actinomicina D durante 8 horas. La actinomicina D entonces fue eliminada y la cantidad de virus producidos fue determinada.

partir de ARN, ahora denominada **transcripción inversa**, fue establecida como un nuevo modo de transferencia de información en sistemas biológicos.

La transcripción inversa es importante no sólo en la replicación de los retrovirus sino también en al menos otros dos aspectos de la biología molecular y celular. Primero, la transcripción inversa no es exclusiva de los retrovirus; ocurre también en las células y, como se indica en los Capítulos 5 y 6, frecuentemente es responsable de la transposición de secuencias de ADN de una localización cromosómica a otra. De hecho, la secuencia del genoma humano ha revelado que aproximadamente el 40% del ADN genómico humano deriva de la transcripción inversa. Segundo, las enzimas que catalizan la síntesis de ADN dirigida por ARN (**transcriptasas inversas**) se utilizan experimentalmente para generar copias de ADN a partir de una molécula de ARN. El uso de la transcriptasa inversa ha permitido el estudio del ARNm de células eucarióticas por medio de los métodos moleculares de manipulación del ADN utilizados actualmente, como será expuesto en la siguiente sección.

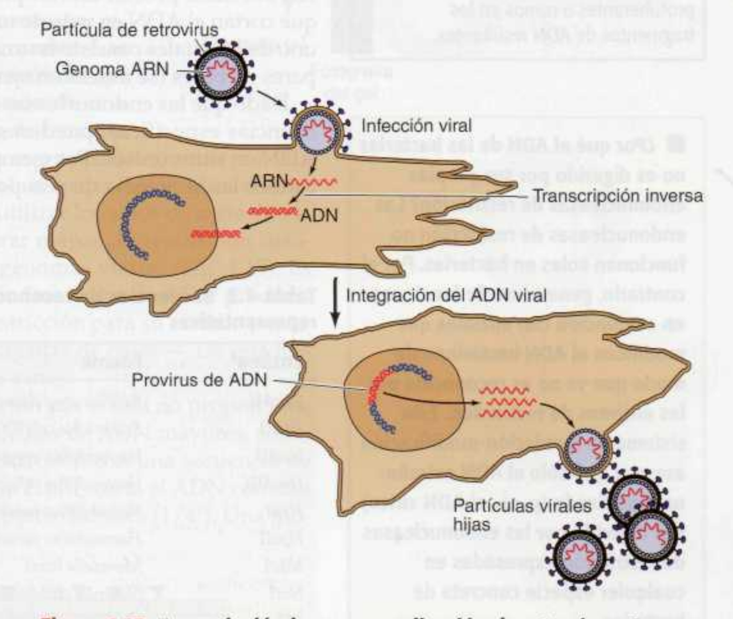


Figura 4.13 Transcripción inversa y replicación de retrovirus. Los retrovirus contienen genomas de ARN en sus partículas virales. Cuando un retrovirus infecta una célula huésped se sintetiza una copia de ADN del ARN viral por medio de la transcriptasa inversa. Este ADN viral se integra en el ADN cromosómico del huésped para constituir un provirus de ADN, que se transcribe para dar lugar a virus ARN hijos.

ADN recombinante

Los experimentos clásicos en biología molecular fueron llamativamente exitosos en el desarrollo de los conceptos fundamentales sobre la naturaleza y expresión de los genes. Dado que estos estudios se basaron en el análisis genético, su éxito dependía en gran medida en la elección como modelos de organismos simples y de rápida replicación (como las bacterias y los virus). Sin embargo, no estaba claro cómo se podrían generalizar estos principios fundamentales para proporcionar un entendimiento molecular de la complejidad de las células eucarióticas, teniendo en cuenta que los genomas de la mayoría de los eucariotas (p. ej., el genoma humano) son hasta mil veces más complejos que el de *E. coli*. A principios de los años 70 el panorama de estudiar dichos genomas a un nivel molecular era desalentador. En particular, no parecía haber una manera de aislar y estudiar genes individuales.

Este obstáculo para el progreso de la biología molecular fue superado por el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, que proporcionó a los científicos la posibilidad de aislar, secuenciar y manipular genes individuales derivados de cualquier tipo celular. La aplicación del ADN recombinante ha permitido el estudio molecular detallado de la estructura y función de los genes eucarióticos, revolucionando nuestro entendimiento de la biología celular.

Endonucleasas de restricción

El primer paso en el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante fue la caracterización de las **endonucleasas de restricción** —enzimas que cortan el ADN en lugares concretos y específicos de su secuencia—. Fueron identificadas en bacterias, donde aparentemente cumplen una función defensiva frente a la entrada en la célula de ADN extraño (p. ej., de un virus). Las bacterias poseen una amplia variedad de endonucleasas de restricción que cortan el ADN en más de un centenar de sitios de reconocimiento, cada uno de los cuales consiste en una secuencia específica de entre cuatro y ocho pares de bases (se muestran ejemplos en la Tabla 4.2).

Dado que las endonucleasas de restricción digieren el ADN a nivel de secuencias específicas, pueden ser utilizadas para cortar una molécula de ADN en sitios únicos. Por ejemplo, la endonucleasa de restricción *Eco*RI reconoce las secuencia de seis pares de bases GAATTC. Esta secuencia está

4.6 Animación web

Endonucleasas de restricción

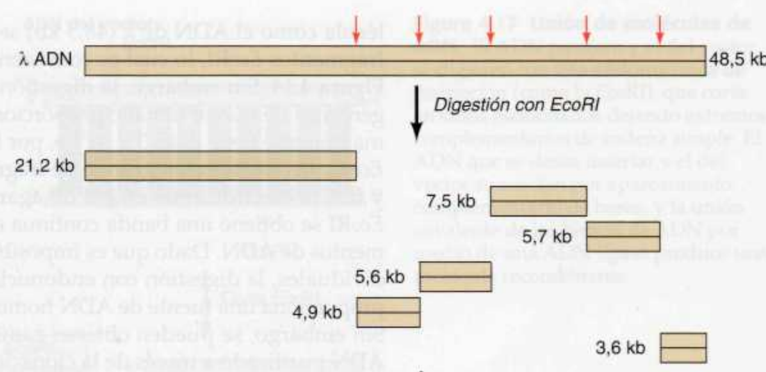
Las endonucleasas de restricción escinden el ADN en secuencias específicas de ADN, dejando extremos protuberantes o romos en los fragmentos de ADN resultantes.

¿Por qué el ADN de las bacterias no es digerido por sus propias endonucleasas de restricción? Las endonucleasas de restricción no funcionan solas en bacterias. Por el contrario, generalmente funcionan en conjunción con enzimas que modifican el ADN bacteriano de modo que ya no es reconocido por las enzimas de restricción. Este sistema de restricción-modificación asegura que sólo el ADN extraño no modificado (p. ej., el ADN vírico) sea digerido por las endonucleasas de restricción expresadas en cualquier especie concreta de bacterias.

Tabla 4.2 Secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción representativas

Enzima[a]	Fuente	Secuencia de reconocimiento[b]
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	GGATCC
*Eco*RI	*Escherichia coli* RY13	GAATTC
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius*	GGCC
*Hin*dIII	*Haemophilus influenzae* Rd	AAGCTT
*Hpa*I	*Haemophilus parainfluenzae*	GTTAAC
*Hpa*II	*Haemophilus parainfluenzae*	CCGG
*Mbo*I	*Moraxella bovis*	GATC
*Not*I	*Nocardia otitidis-caviarum*	GCGGCCGC
*Sfi*I	*Streptomyces fimbriatus*	GGCCNNNNNGGCC
*Taq*I	*Thermus aquaticus*	TCGA

[a] Las enzimas se nombran según la especie de la que se aislaron, seguido por un número para distinguir distintas enzimas aisladas a partir del mismo organismo (p. ej., *Hpa*I y *Hpa*II).
[b] Las secuencias de reconocimiento muestran únicamente la secuencia de una cadena del ADN de doble cadena. «N» representa cualquier base.



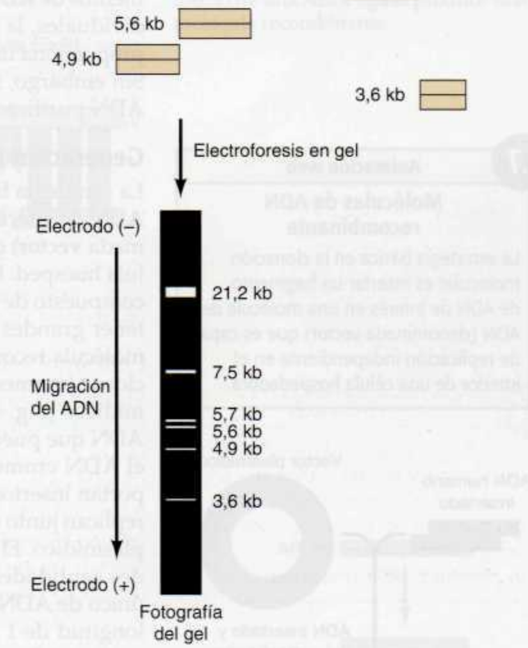


Figura 4.14 Digestión con *Eco*RI y electroforesis del ADN del fago λ. La enzima *Eco*RI corta el ADN del fago λ por cinco sitios (flechas), produciendo seis fragmentos de ADN. Estos fragmentos se separan por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN migran hacia el electrodo positivo, desplazándose con más rapidez los de menor tamaño. Tras la electroforesis el ADN se tiñe con un pigmento fluorescente y se fotografía. Se indican los tamaños de los fragmentos de ADN.

presente cinco veces en el ADN del bacteriófago λ, por lo que la enzima *Eco*RI digiere el ADN del fago λ en seis fragmentos de entre 3,6 y 21,2 kilobases de longitud (1 kilobase o kb = 1.000 pares de bases) (Fig. 4.14). Estos fragmentos pueden separarse según su tamaño por medio de **electroforesis en gel** —un método por el que se separan las moléculas basándose en su velocidad de migración en un campo eléctrico—. El gel, habitualmente compuesto de agarosa o poliacrilamida, se sitúa entre dos compartimentos con electrodos en los que se dispone un tampón o *buffer*. La muestra (p. ej., la mezcla de fragmentos de ADN para ser analizados) se deposita en ranuras preformadas y se aplica el campo eléctrico. Los ácidos nucleicos tienen carga negativa (debido a los residuos fosfato de su estructura), por lo que migran hacia el electrodo positivo. El gel se comporta como un filtro poroso que retrasa la migración de los fragmentos más grandes. Las moléculas de menor tamaño se mueven a través del gel con mayor rapidez, permitiendo la separación de una mezcla de ácidos nucleicos en función de su tamaño.

El orden de los fragmentos de restricción se puede determinar por una serie de métodos, obteniéndose (por ejemplo) un mapa de los sitios de corte de *Eco*RI en el ADN del fago λ. Se pueden utilizar los sitios de corte de varias endonucleasas de restricción para generar **mapas de restricción** detallados de las moléculas de ADN, como los genomas virales (Fig. 4.15). Es posible aislar con electroforesis fragmentos individuales de ADN producidos por la digestión con endonucleasas de restricción para su estudio posterior —incluyendo la determinación de su secuencia de bases—. De esta forma se han caracterizado los ADN de muchos virus.

La digestión con endonucleasas de restricción por sí sola no proporciona suficiente resolución para el análisis de moléculas de ADN mayores, como genomas celulares. Una endonucleasa de restricción con una secuencia de reconocimento de seis pares de bases (como la *Eco*RI) corta el ADN con una frecuencia estadística de un corte cada 4.096 pares de bases ($1/4^6$). Una mo-

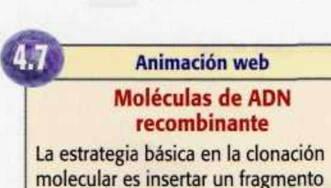
λ

Adenovirus

BamHI
EcoRI
HindIII

Figura 4.15 Mapas de restricción del ADN de λ y del ADN del adenovirus humano 2. La localización de los sitios de corte de *Bam*HI, *Eco*RI y *Hin*dIII se muestran en los ADN del bacteriófago λ de *E. coli* (48,5 kb) y del adenovirus humano 2 (35,9 kb).

lécula como el ADN de λ (48,5 kb) se podría esperar que diera unos diez fragmentos *Eco*RI, lo cual es consistente con los resultados ilustrados en la Figura 4.14. Sin embargo, la digestión con endonucleasas de restricción de genomas de mayor tamaño proporciona resultados muy distintos. El genoma humano tiene unas 3×10^6 kb, por lo que daría unos 500.000 fragmentos *Eco*RI. Un número tan grande de fragmentos no se pueden separar entre sí y tras la electroforesis en gel de agarosa del ADN humano digerido con *Eco*RI se obtiene una banda continua en vez de un patrón discreto de fragmentos de ADN. Dado que es imposible aislar fragmentos de restricción individuales, la digestión con endonucleasas de restricción por sí misma no proporciona una fuente de ADN homogéneo apropiado para ser estudiado. Sin embargo, se pueden obtener cantidades suficientes de fragmentos de ADN purificado a través de la clonación molecular.



4.7 Animación web

Moléculas de ADN recombinante

La estrategia básica en la clonación molecular es insertar un fragmento de ADN de interés en una molécula de ADN (denominada vector) que es capaz de replicación independiente en el interior de una célula hospedadora.

Generación de moléculas de ADN recombinante

La estrategia básica en la **clonación molecular** es insertar un fragmento de ADN de interés (p. ej., un segmento de ADN humano) en una molécula (llamada **vector**) que es capaz de replicarse de forma independiente en una célula huésped. El resultado es una **molécula recombinante** o **clon molecular** compuesto de las secuencias del ADN insertado y del vector. Se pueden obtener grandes cantidades del ADN insertado si se permite replicarse a la molécula recombinante en un huésped apropiado. Por ejemplo, se pueden clonar fragmentos de ADN humano pueden ser clonados en vectores plasmídicos (Fig. 4.16). Los **plásmidos** son pequeñas moléculas circulares de ADN que pueden replicarse independientemente —sin estar asociados con el ADN cromosómico— en bacterias. Los plásmidos recombinantes que portan insertos de ADN humano pueden ser introducidos en *E. coli*, donde replican junto con las bacterias para dar lugar a millones de copias del ADN plasmídico. El ADN de estos plásmidos puede aislarse, obteniéndose grandes cantidades de moléculas recombinantes que contienen un fragmento único de ADN humano. Mientras que un fragmento típico de ADN de una longitud de 1 kb representaría menos de una parte en un millón de ADN genómico humano, representaría aproximadamente una parte en cinco después de ser clonado en un vector plasmídico. Adicionalmente el fragmento puede ser aislado de manera sencilla del resto del ADN del vector utilizando las mismas endonucleasas de restricción usadas para su inserción y realizando una electroforesis en gel, permitiendo el análisis y posterior manipulación de un fragmento puro de ADN humano.

Los fragmentos de ADN utilizados para crear moléculas de ADN recombinante son generados por digestión con endonucleasas de restricción. Muchas de estas enzimas cortan sus secuencias de reconocimiento de forma escalonada, generando extremos complementarios o cohesivos de una sola hebra que pueden asociarse entre sí por apareamiento complementario de bases (Fig. 4.17). Los extremos complementarios emparejados pueden conectarse de forma definitiva por medio de una **ADN ligasa**, una enzima que repara roturas en las hebras de ADN (véase Cap. 6). De esta forma dos fragmentos distintos de ADN (p. ej., un inserto de ADN humano y un vector plasmídico de ADN) acondicionados tras digestión por la misma endonucleasa de restricción pueden ser unidos para crear una molécula de ADN recombinante.

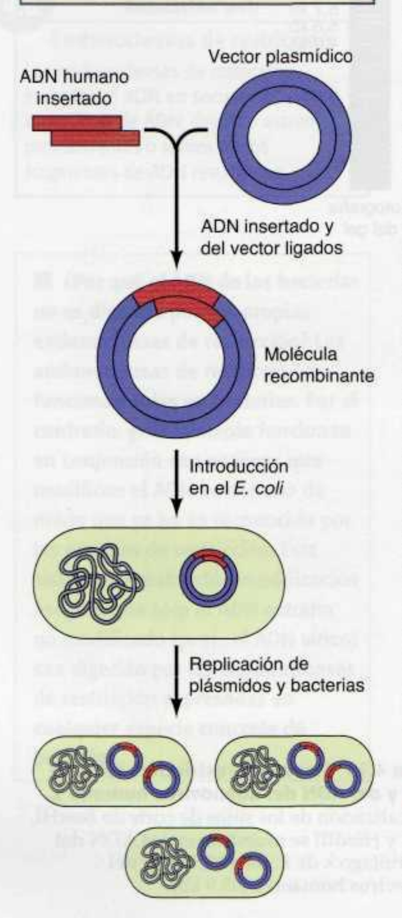


Figura 4.16 Generación de una molécula de ADN recombinante. Un fragmento de ADN humano es insertado en un vector plasmídico de ADN. La molécula recombinante resultante se introduce a continuación en *E. coli*, donde se replica junto con la bacteria para generar una población de bacterias portadoras de plásmidos con el inserto de ADN humano.

Figura 4.17 Unión de moléculas de ADN. El ADN pasajero y el del vector se digieren con una endonucleasa de restricción (como la *Eco*RI), que corta en sitios escalonados dejando extremos complementarios de cadena simple. El ADN que se desea insertar y el del vector se asocian por apareamiento complementario de bases, y la unión covalente de las hebras de ADN por medio de una ADN ligasa produce una molécula recombinante.

Los fragmentos de ADN que pueden ser clonados no se limitan a aquellos que terminan en sitios de corte de enzimas de restricción. Es posible añadir a los extremos de cualquier fragmento de ADN, permitiendo que prácticamente cualquier fragmento de ADN sea ligado a un vector y aislado como un clon molecular.

Además del ADN, es posible clonar también secuencias de ARN (Fig. 4.18). El primer paso es sintetizar una copia de ADN a partir del ARN por medio de la transcriptasa inversa. El ADN producido (denominado **ADNc** porque es complementario al ARN utilizado como molde) se liga al vector de ADN del modo antes descrito. Dado que los genes eucarióticos están habitualmente interrumpidos por secuencias no codificantes o intrones (véase Cap. 5), que se eliminan del ARNm por corte y empalmado o *splicing*, la posibilidad de clonar ADNc además del ADN genómico ha sido crítica para el entendimiento de la estructura y función de los genes. Además, la clonación del ADNc permite que el ARNm correspondiente a un solo gen sea aislado como un gen molecular.

Vectores para ADN recombinante

Dependiendo del tamaño del ADN que se inserta y del propósito del experimento es posible utilizar distintos vectores de clonación para generar mo-

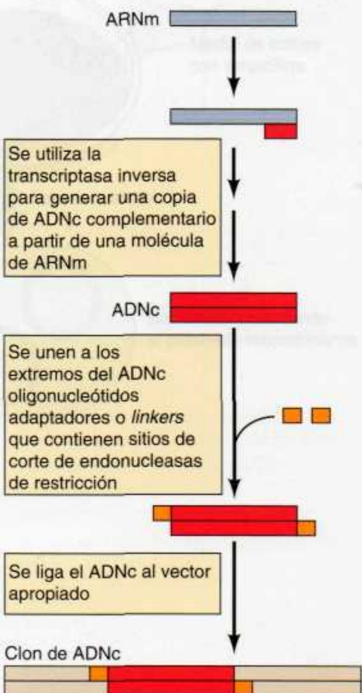


Figura 4.18 Clonación de ADN complementario.

léculas recombinantes. Los sistemas más básicos para el aislamiento y propagación de ADN clonado se exponen aquí. Otros tipos de vectores desarrollados para expresar ADN clonado e introduccir moléculas recombinantes en células eucarióticas se discuten en secciones posteriores.

Los plásmidos generalmente se usan para clonar insertos de ADN genómico o ADNc de hasta unos pocos miles de pares de bases. Los vectores plasmídicos generalmente consisten en 2 a 4 kb de ADN, incluyendo un **origen de replicación** —la secuencia de ADN que señaliza a la ADN polimerasa de la célula hospedadora para que replique la molécula de ADN—. Adicionalmente, los vectores plasmídicos portan genes que confieren resistencia a antibióticos (p. ej., resistencia a ampicilina), de forma que las bacterias que portan el plásmido puedan ser seleccionadas. Por ejemplo, en la Figura 4.19 se ilustra el aislamiento de clones de ADNc humano en un vector plasmídico. Un grupo de fragmentos de ADNc son ligados a un plásmido de ADN previamente digerido mediante una endonucleasa de restricción. Las moléculas de ADN recombinantes resultantes se emplean a continuación para transformar *E. coli*. Las colonias resistentes a antibióticos, que contienen el ADN plasmídico, son seleccionadas. Puesto que cada plásmido recombinante da lugar a una sola colonia resistente a antibiótico, las bacterias presentes en una cualquiera de estas colonias contendrán un único inserto de ADNc. Las bacterias que contengan el plásmido de interés pueden crecerse en grandes cantidades y extraerse su ADN. Las pequeñas moléculas circulares de ADN plasmídico, de las que a menudo existen cientos de copias por célula, pueden separarse del ADN cromosómico bacteriano; el resultado es ADN plasmídico purificado apropiado para el análisis del inserto clonado.

Los vectores de bateriófago λ también son empleado para el aislamiento tanto de ADN genómico como de clones de ADNc a partir de células eucariotas, y puede acomodar fragmentos mayores de ADN inserto que los plásmidos. En los vectores de clonación λ, las secuencias del genoma del bacteriófago que son dispensables para la replicación viral han sido eliminadas y sustituidas por sitios únicos de restricción para la inserción de ADN clonado. Estas moléculas recombinantes pueden ser introducidas en *E. coli*, donde se replican y generan millones de fagos progenie que contienen un solo inserto de ADN. El ADN de estos fagos puede entonces aislarse, dando lugar a grandes cantidades de moléculas recombinantes que contienen un solo fragmento de ADN clonado. Los insertos de ADN pueden ser de hasta 15 kb y generar un genoma recombinante que puede ser empaquetado en las partículas de bacteriófago λ.

En determinados estudios de análisis de ADN genómico es preciso clonar fragmentos de ADN mayores de lo que un fago λ puede portar. Existen cinco tipos principales de vectores empleados con este fin (Tabla 4.3). Vectores de tipo **cósmico** que acomodan insertos de aproximadamente 45 kb. Estos vectores contienen secuencias del bacteriófago λ que permiten el empaquetamiento eficiente del ADN clonado en partículas de fago. Además, los cósmicos contienen orígenes de replicación y genes para la resistencia a antibióticos que son característicos de los plásmidos, de modo que pueden replicarse como plásmidos en el interior de células bacterianas. Otros dos tipos de vectores se derivan del bacteriófago P1, en lugar del bacteriófago λ. Los vectores derivados del bacteriófago P1, que permiten acomodar fragmentos de ADN de 70 a 100 kb, contienen secuencias que permiten el empaquetamiento de moléculas recombinantes *in vitro* en partículas de fago P1 para a continuación replicarse como plásmidos en *E. coli*. Los vectores de tipo **cromosoma artificial P1 (PAC)** también contienen secuencias del bacteriófago P1, pero se introducen directamente como plásmidos en *E. coli* y pueden acomodar insertos mayores de 130 a 150 kb. Los vectores de tipo

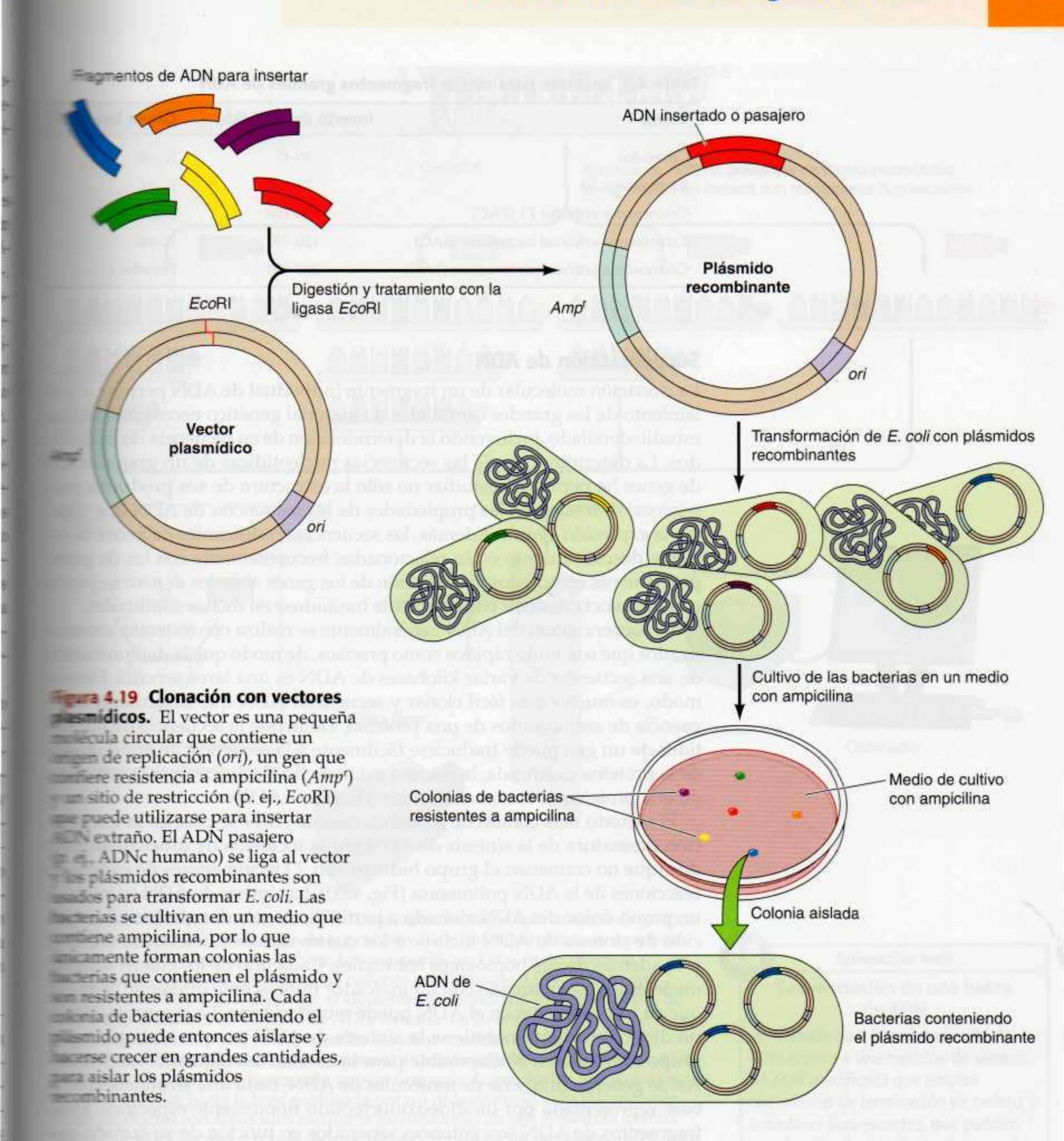


Figura 4.19 Clonación con vectores plasmídicos. El vector es una pequeña molécula circular que contiene un origen de replicación (*ori*), un gen que confiere resistencia a ampicilina (*Amp*^{r}) y un sitio de restricción (p. ej., *Eco*RI) que puede utilizarse para insertar ADN extraño. El ADN pasajero (p. ej., ADNc humano) se liga al vector y los plásmidos recombinantes son usados para transformar *E. coli*. Las bacterias se cultivan en un medio que contiene ampicilina, por lo que únicamente forman colonias las bacterias que contienen el plásmido y son resistentes a ampicilina. Cada colonia de bacterias conteniendo el plásmido puede entonces aislarse y hacerse crecer en grandes cantidades, para aislar los plásmidos recombinantes.

cromosoma artificial de bacteriófago (BAC) se derivan de un plásmido que ocurre de forma natural en *E. coli* (denominado el factor F). El origen de replicación y otras secuencias del factor F permite a los BAC replicarse como plásmidos estables que contienen insertos de 120 a 300 kb. Fragmentos incluso mayores de ADN (250-400 kb) pueden clonarse en vectores de tipo **cromosoma artificial de levadura (YAC)**. Estos vectores contienen orígenes de replicación de levaduras además de otras secuencias (centrómeros y telómeros, estudiados en el Cap. 5) que les permiten replicarse como moléculas lineares tipo cromosoma en el interior de células de levadura.

Tabla 4.3 Vectores para clonar fragmentos grandes de ADN

Vector	Inserto de ADN (kb)	Célula huésped
Cósmidos	30-45	*E. coli*
Bacteriófago P1	70-100	*E. coli*
Cromosoma artificial P1 (PAC)	130-150	*E. coli*
Cromosoma artificial bacteriano (BAC)	120-300	*E. coli*
Cromosoma artificial de levadura (YAC)	250-400	Levadura

Secuenciación de ADN

La clonación molecular de un fragmento individual de ADN permite el aislamiento de las grandes cantidades de material genético necesarias para su estudio detallado, incluyendo la determinación de su secuencia de nucleótidos. La determinación de las secuencias nucleotídicas de un gran número de genes ha permitido estudiar no sólo la estructura de sus productos proteínicos, sino también las propiedades de las secuencias de ADN que regulan la expresión génica. Además, las secuencias codificantes de genes de reciente descubrimiento están relacionadas frecuentemente con las de genes previamente estudiados, y la función de los genes aislados *de novo* se puede con frecuencia deducir correctamente basándose en dichas similitudes.

La secuenciación del ADN generalmente se realiza con sistemas automatizados que son tanto rápidos como precisos, de modo que la determinación de una secuencia de varias kilobases de ADN es una tarea sencilla. De este modo, es mucho más fácil clonar y secuenciar ADN que determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína. Dado que la secuencia de nucleótidos de un gen puede traducirse fácilmente a la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, la manera más sencilla de determinar la secuencia de una proteína es secuenciar un gen clonado o ADNc.

El método más común de secuenciación de ADN se basa en la interrupción prematura de la síntesis de ADN por la inclusión de **dideoxinucleótidos** (que no contienen el grupo hidroxilo en 3′) terminadores de cadena en reacciones de la ADN polimerasa (Fig. 4.20). La síntesis de ADN se inicia en un punto único del ADN clonado a partir de un cebador sintético. La reacción de síntesis de ADN incluye a los cuatro dideoxinucleótidos (A, C, G y T) además de sus homólogos habituales. Cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos está marcado con un marcador fluorescente diferente, de modo que su incorporación en el ADN puede monitorizarse. La incorporación de un dideoxinucleótido detiene la síntesis de ADN porque no hay ningún grupo hidroxilo en 3′ disponible para la adición del siguiente nucleótido. Así se generan una serie de moléculas de ADN, cada una terminando en la base representada por un dideoxinucleótido fluorescente específico. Estos fragmentos de ADN son entonces separados en función de su tamaño mediante electroforesis en gel. A medida que se resuelven las bandas de ADN recién sintetizadas a través del gel, pasan a través de un haz de láser que excita los marcadores fluorescentes. La luz emitida resultante es detectada por un fotomultiplicador, y un ordenador recolecta y analiza los datos. El tamaño de cada fragmento se determina por su dideoxinucleótido terminal, marcado por un color específico de fluorescencia, de modo que la secuencia de ADN puede ser leída por el orden de fragmentos marcados con fluorescencia a medida que migran a través del gel. La secuenciación automática de alto rendimiento de este tipo, ha permitido el análisis a gran escala necesario para la determinación de las secuencias de genomas completos, incluyendo el humano.

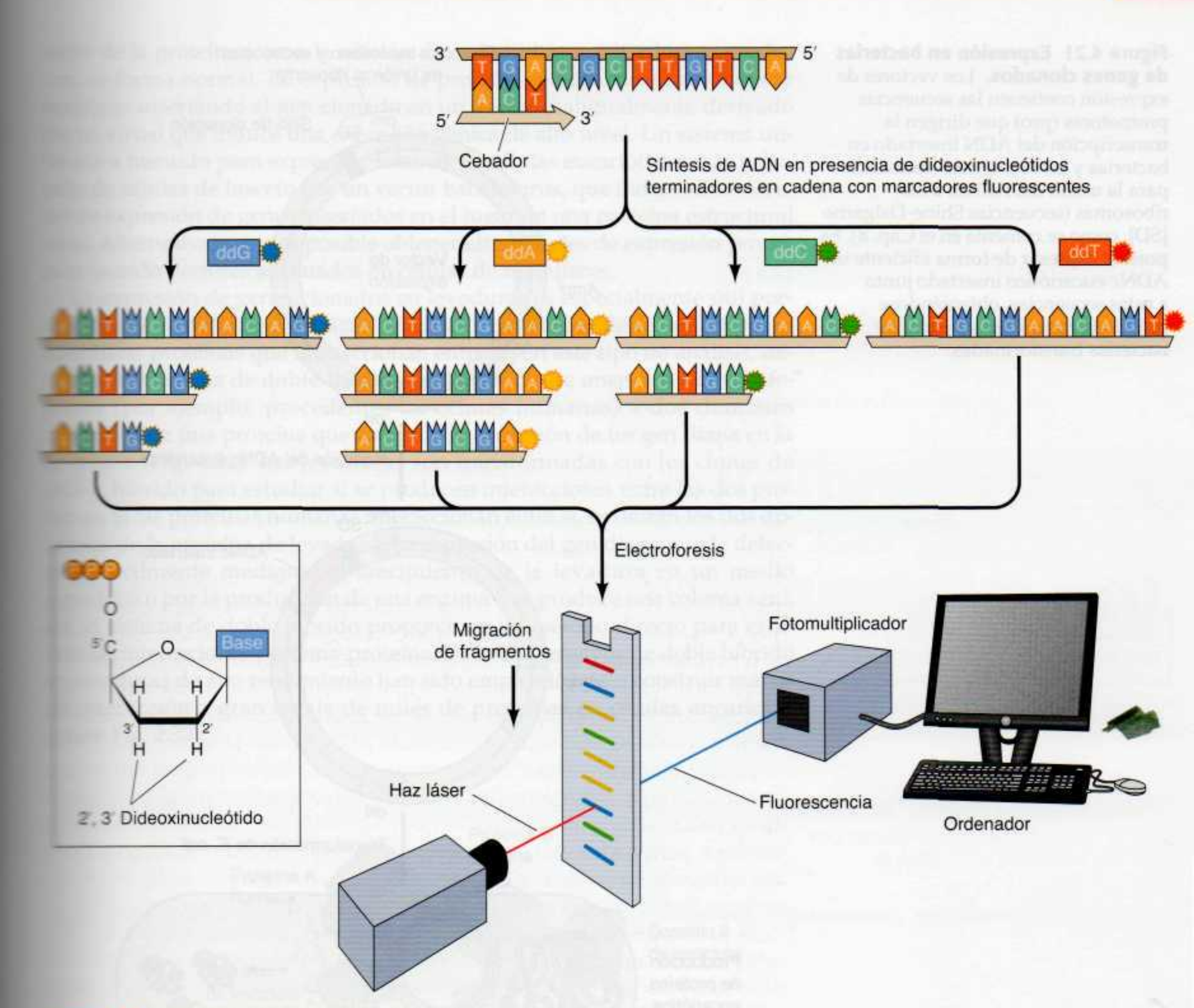


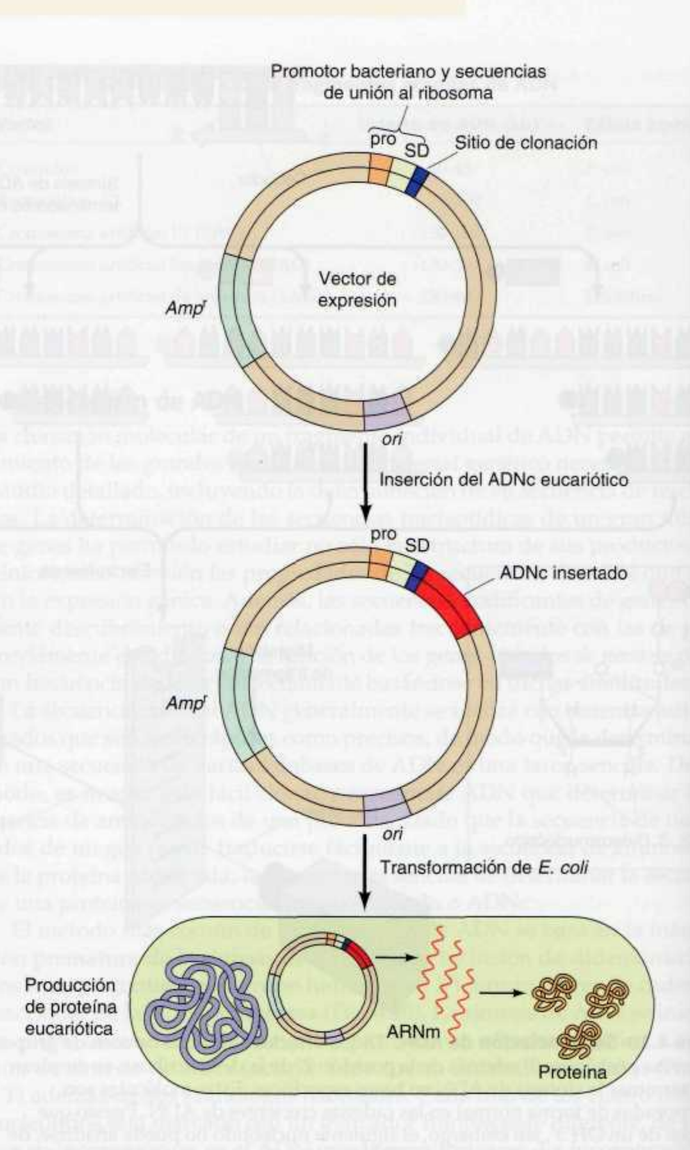
Figura 4.20 Secuenciación de ADN. Dideoxinucleótidos, que carecen de grupos OH en las posiciones 3′ además de la posición 2′ de la desoxirribosa, se emplean para terminar la síntesis de ADN en bases específicas. Estas moléculas son incorporadas de forma normal en las cadenas crecientes de ADN. Puesto que carecen de un OH 3′, sin embargo, el siguiente nucleótido no puede añadirse, de forma que la síntesis de la hebra de ADN termina. La síntesis de ADN es iniciada en un sitio específico con un cebador. La reacción contiene cuatro dideoxinucleótidos. Cuando se incorpora el dideoxinucleótido, la síntesis de ADN se detiene, de forma que la reacción genera una serie de productos que se extienden desde el cebador hasta la base sustituida por un dideoxinucleótido fluorescente. Estos productos son separados mediante electroforesis en gel. A medida que las hebras de ADN migran a través del gel, pasan a través de un haz láser que excita a los marcadores fluorescentes de los dideoxinucleótidos. La luz emitida es detectada por un fotomultiplicador que está conectado a un ordenador que recolecta y analiza los datos que determinan la secuencia de ADN.

> **4.8 Animación web**
>
> **Secuenciación de una hebra de ADN**
>
> Un método para la secuenciación de ADN implica a una reacción de síntesis de ADN modificada que emplea nucleótidos de terminación de cadena y cebadores fluorescentes, que pueden ser identificados mediante sistemas de detección automatizados.

Expresión de genes clonados

Además de permitir la determinación de la secuencia de nucleótidos de los genes —y por tanto la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas— la clonación molecular ha proporcionado nuevas posibilidades en la obtención de grandes cantidades de proteínas para su caracterización estructural y funcional. Muchas proteínas de interés están presentes a muy

Figura 4.21 Expresión en bacterias de genes clonados. Los vectores de expresión contienen las secuencias promotoras (pro) que dirigen la transcripción del ADN insertado en bacterias y las secuencias necesarias para la unión del ARNm a los ribosomas (secuencias Shine-Dalgarno [SD], como se comenta en el Cap. 8). Es posible expresar de forma eficiente un ADNc eucariótico insertado junto a estas secuencias, obteniéndose proteínas eucarióticas a partir de bacterias transformadas.



baja concentración en células eucarióticas y por tanto no pueden purificarse en cantidades significativas por técnicas bioquímicas convencionales. Sin embargo una vez clonado su gen este problema puede ser solucionado con el desarrollo de vectores que consigan altos niveles de expresión genética en bacterias o células eucarióticas.

Para expresar un gen eucariótico en *E. coli* el ADNc de interés se clona con un fago o un plásmido (denominados **vectores de expresión**) que contenga las secuencias que dirigen la transcripción y traducción del gen insertado en bacterias (Fig. 4.21). Los genes insertados se llegan a expresar a niveles tales que la proteína codificada por el gen clonado supone el 10% del total de la producción de proteína bacteriana. La purificación posterior de cantidades suficientes de la proteína para estudios bioquímicos o estructurales es una tarea sencilla.

En ocasiones es más útil expresar un gen clonado en una célula eucariótica en lugar de hacerlo en una bacteria. Este modo de expresión es importante, por ejemplo, para asegurarse de que las modificaciones postraducci-

nales de la proteína (como la adición de carbohidratos o lípidos) se producen de forma normal. La expresión de proteínas en células eucarióticas se consigue insertando el gen clonado en un vector (habitualmente derivado de un virus) que induce una expresión génica de alto nivel. Un sistema utilizado a menudo para expresar proteínas en células eucarióticas es la infección de células de insecto por un vector baculovirus, que induce altos niveles de expresión de genes insertados en el lugar de una proteína estructural viral. Alternativamente es posible obtener altos niveles de expresión proteínica usando vectores adecuados en células de mamíferos.

La expresión de genes clonados en levaduras es especialmente útil porque pueden emplearse técnicas sencillas de genética de levaduras para identificar proteínas que interaccionan entre sí. En este tipo de análisis, denominado sistema de **doble-híbrido en levaduras**, se unen dos ADNc diferentes (por ejemplo, procedentes de células humanas) a dos dominios diferentes de una proteína que estimula la expresión de un gen diana en la levadura (Fig. 4.22). Las levaduras son transformadas con los clones de ADNc híbrido para estudiar si se producen interacciones entre las dos proteínas. Si las proteínas humanas interaccionan entre sí, se unirán los dos dominios de la proteína de levadura. La expresión del gen diana puede detectarse fácilmente mediante el crecimiento de la levadura en un medio específico o por la producción de una enzima que produce una colonia azul, así, el sistema de doble híbrido proporciona un método directo para estudiar las interacciones proteína-proteína. De hecho, ensayos de doble híbrido en levaduras de alto rendimiento han sido empleados para construir mapas de interacción a gran escala de miles de proteínas en células eucariotas (véase Fig. 2.33).

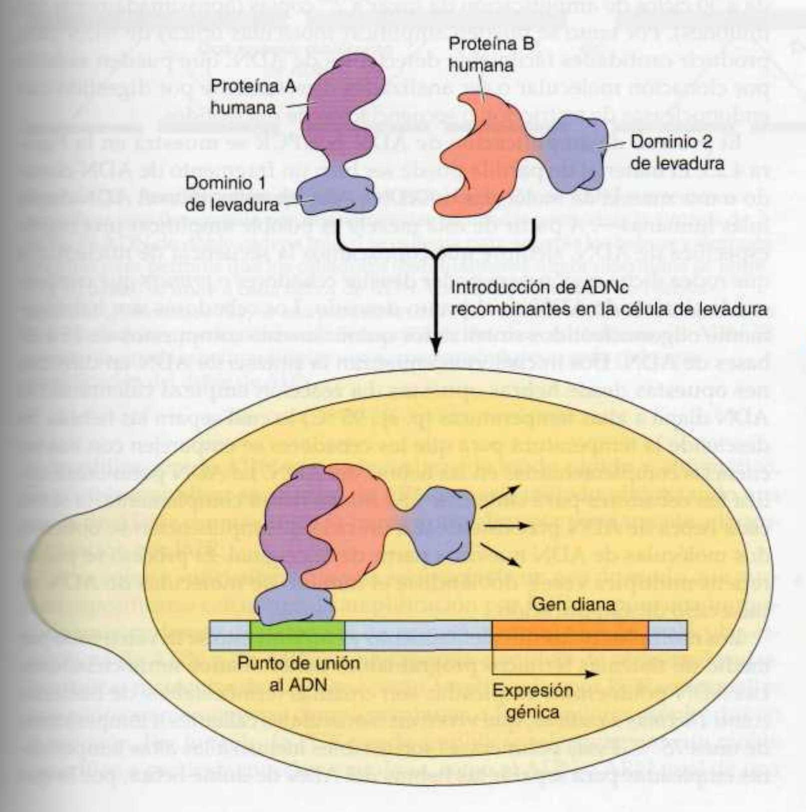


Figura 4.22 El sistema de doble-híbrido de levaduras. Los ADNc de dos proteínas humanas son clonadas como fusiones con dos dominios (designados 1 y 2) de una proteína de levadura que estimula la transcripción de un gen diana. Los dos ADNc recombinantes son introducidos en una célula de levadura. Si las dos proteínas humanas interaccionan entre sí, se produce la aproximación de los dos dominios de la proteína de levadura. El dominio 1 se une a las secuencias de ADN en un punto de inicio anterior al gen diana, y el dominio 2 estimula la transcripción del gen diana. La interacción entre dos proteínas humanas puede por tanto detectarse mediante la expresión del gen diana en la levadura transformada.

Detección de ácidos nucleicos y proteínas

El advenimiento de la clonación molecular ha permitido el aislamiento y caracterización de genes individuales procedentes de células eucariotas. La comprensión del papel de los genes en el interior celular, sin embargo, requiere del análisis de la organización intracelular y de la expresión de los genes individuales y de las proteínas que codifican. En esta sección, los procedimientos básicos empleados para la detección de ácidos nucleicos y proteínas específicos son analizados. Estas técnicas son importantes para una amplia variedad de estudios, incluyendo el mapeo de genes a cromosomas, el análisis de la expresión génica, la localización de proteínas en orgánulos subcelulares.

Amplificación de ADN con la reacción en cadena de la polimerasa

4.9 Animación web

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa permite la producción de millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula de ADN al inicio.



La clonación molecular permite producir y aislar grandes cantidades de un ADN en particular. La **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**, desarrollada por Kary Mullis en 1988, es un método alternativo para conseguir un gran número de fragmentos de material genético a partir de una única copia de ADN. Siempre que se conozca parte de la secuencia de la molécula de ADN, la PCR puede conseguir una gran amplificación del ADN por medio de reacciones llevadas a cabo completamente *in vitro*. La ADN polimerasa se emplea para replicar repetidamente un segmento determinado de ADN. El número de secuencias de ADN va incrementando de modo exponencial, doblándose con cada ciclo de replicación, por lo que se puede obtener una cantidad sustancial de copias a partir de un pequeño número de moldes de ADN iniciales. Por ejemplo, una única molécula de ADN sometida a 30 ciclos de amplificación da lugar a 2^{30} copias (aproximadamente mil millones). Por tanto se pueden amplificar moléculas únicas de ADN para producir cantidades fácilmente detectables de ADN, que pueden aislarse por clonación molecular o ser analizadas directamente por digestión con endonucleasas de restricción o secuenciación de nucleótidos.

El proceso de amplificación de ADN por PCR se muestra en la Figura 4.23. El material de partida puede ser bien un fragmento de ADN clonado o una mezcla de moléculas de ADN —por ejemplo, todo el ADN de células humanas—. A partir de esta mezcla es posible amplificar una región específica de ADN, siempre que conozcamos la secuencia de nucleótidos que rodea dicha región para poder diseñar cebadores o *primers* que comiencen la síntesis de ADN en el punto deseado. Los cebadores son habitualmente oligonucleótidos sintetizados químicamente compuestos de 15 a 20 bases de ADN. Dos iniciadores comienzan la síntesis de ADN en direcciones opuestas desde hebras opuestas. La reacción empieza calentando el ADN diana a altas temperaturas (p. ej., 95 °C) lo cual separa las hebras. Se desciende la temperatura para que los cebadores se emparejen con sus secuencias complementarias en las hebras del ADN. La ADN polimerasa utiliza los cebadores para sintetizar una nueva hebra complementaria sobre cada hebra de ADN preexistente. En un ciclo de amplificación se obtienen dos moléculas de ADN nuevas a partir de la original. El proceso se puede repetir múltiples veces, doblándose el número de moléculas de ADN en cada ciclo de amplificación.

Los múltiples ciclos de calentamiento y enfriamiento se llevan a cabo por medio de sistemas térmicos programables denominados termocicladores. Las ADN polimerasas empleadas son enzimas termoestables de bacterias como *Thermus aquaticus*, que viven en manantiales calientes a temperaturas de unos 75 °C. Estas polimerasas son estables incluso a las altas temperaturas empleadas para separar las hebras del ADN de doble hebra, por lo que

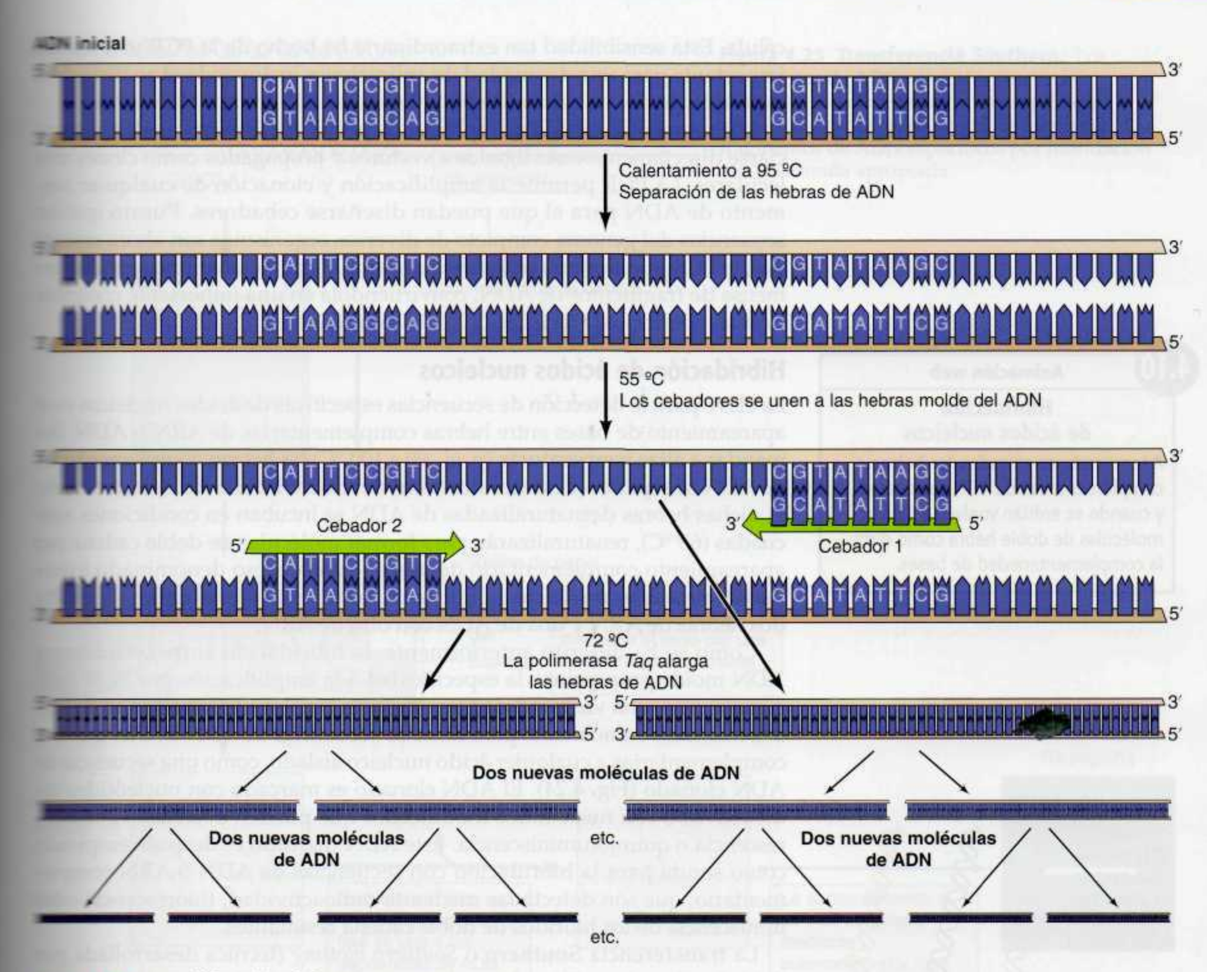


Figura 4.23 Amplificación del ADN por PCR. La región de ADN que se desea amplificar está flanqueada por dos secuencias utilizadas para cebar la síntesis de ADN. El ADN de doble cadena inicial se calienta para separar las hebras y después se enfría para permitir que los cebadores (habitualmente oligonucleótidos de entre 15 y 20 bases) se unan a cada hebra de ADN. La ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (polimerasa *Taq*) se usa para sintetizar nuevas hebras de ADN empezando en los cebadores, produciéndose la formación de dos nuevas moléculas de ADN. El proceso se puede repetir múltiples veces, consiguiéndose en cada ciclo una amplificación del doble de ADN.

la amplificación de ADN se puede realizar de modo rápido y automático. Es posible amplificar secuencias de ARN por este método, sintetizando una copia de ADNc por medio de la transcriptasa inversa previamente a la amplificación por PCR.

Si se conoce suficientemente una secuencia de un gen de modo que puedan especificarse cebadores, la amplificación por PCR proporciona un método muy poderoso de detección de pequeñas cantidades de moléculas específicas de ADN o de ARN en una mezcla compleja de otras moléculas. Las únicas moléculas de ADN que serán amplificadas por PCR son aquellas que contengan secuencias complementarias a los cebadores empleados en la reacción. Por lo tanto, la PCR puede amplificar selectivamente un molde específico a partir de mezclas complejas, como el ADN o ARN total de una

■ **La PCR se ha convertido en un método forense extremadamente potente. La amplificación por PCR permite a los investigadores obtener un perfil de ADN a partir de muestras pequeñas de ADN presentes en una escena de crimen.**

célula. Esta sensibilidad tan extraordinaria ha hecho de la PCR una técnica importante para una diversidad de aplicaciones incluyendo el análisis de la expresión génica en células disponibles en cantidades muy limitadas.

Los segmentos de ADN amplificados por PCR también pueden secuenciarse directamente o ser ligados a vectores y propagados como clones moleculares. La PCR permite la amplificación y clonación de cualquier segmento de ADN para el que puedan diseñarse cebadores. Puesto que las secuencias del genoma completo de diversos organismos son ahora conocidas, la PCR puede ahora utilizarse para amplificar y clonar una cantidad inmensa de fragmentos de ADN, convirtiéndola en una importante contribución al repertorio de técnicas de ADN recombinante.



4.10 **Animación web**

Hibridación de ácidos nucleicos

A temperaturas elevadas, las hebras complementarias de ADN se separan, y cuando se enfrían vuelven a formar moléculas de doble hebra como dicta la complementariedad de bases.

Hibridación de ácidos nucleicos

La clave para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos es el apareamiento de bases entre hebras complementarias de ARN o ADN. Sometidas a altas temperaturas (p. ej., 90 a 100 °C) las hebras complementarias de ADN se separan (desnaturalización) dando moléculas de cadena simple. Si dichas hebras desnaturalizadas de ADN se incuban en condiciones adecuadas (65 °C), renaturalizarán para formar moléculas de doble cadena por apareamiento complementario de bases —un proceso denominado **hibridación de ácidos nucleicos**—. Pueden hibridar entre sí dos hebras de ADN, dos hebras de ARN y una de ADN con otra de ARN.

Como se ha descrito anteriormente, la hibridación entre cebadores y ADN molde proporciona la especificidad a la amplificación por PCR. Adicionalmente, una variedad de otras técnicas emplean la hibridación de ácidos nucleicos como medio para detectar secuencias de ADN o ARN que sean complementarias a cualquier ácido nucleico aislado, como una secuencia de ADN clonado (Fig. 4.24). El ADN clonado es marcado con nucleótidos radioactivos o con nucleótidos modificados que pueden detectarse por fluorescencia o quimioluminiscencia. Este ADN marcado es después empleado como sonda para la hibridación con secuencias de ADN o ARN complementario, que son detectadas mediante radioactividad, fluorescencia o luminiscencia de los híbridos de doble cadena resultantes.

La **transferencia Southern** o *Southern blotting* (técnica desarrollada por E. M. Southern) se utiliza de modo generalizado para la detección de genes específicos en el ADN celular (Fig. 4.25). El ADN problema es digerido por una endonucleasa de restricción, y los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis. El gel se adhiere a un filtro de nitrocelulosa o nylon, al cual se transfieren los fragmentos de ADN, para dar una réplica del gel. El filtro es entonces incubado con una sonda marcada, que hibrida con los fragmentos de ADN que contienen la secuencia complementaria, permitiendo la visualización de estos fragmentos específicos de ADN celular.

La **transferencia Northern** o *Northern blotting* es una variante de la técnica de transferencia de Southern, utilizada para la detección de ARN en vez de ADN. La totalidad del ARN celular es extraída y fraccionada según su tamaño por electroforesis en gel. De igual forma que en la transferencia de Southern, los ARN se transfieren a un filtro y se detectan por hibridación

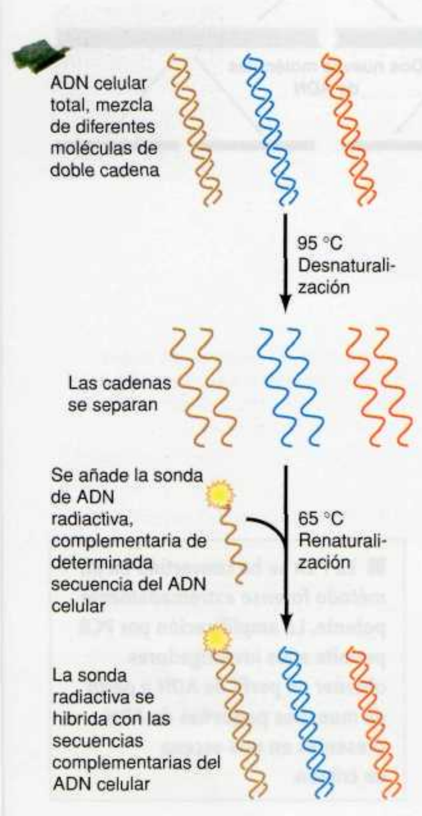


Figura 4.24 Detección de ADN por hibridación de ácidos nucleicos. Puede detectarse una secuencia específica entre todo el ADN celular por hibridación con una sonda de ADN marcada radiactivamente. Se desnaturaliza el ADN calentándolo hasta 95 °C, obteniéndose moléculas de cadena única. Se añade la sonda marcada radiactivamente y se baja la temperatura hasta los 65 °C, permitiendo que las cadenas de ADN complementarias se apareen entre sí. La sonda marcada se hibrida con las secuencias complementarias del ADN celular, que pueden ser detectadas entonces como moléculas radiactivas de doble cadena.

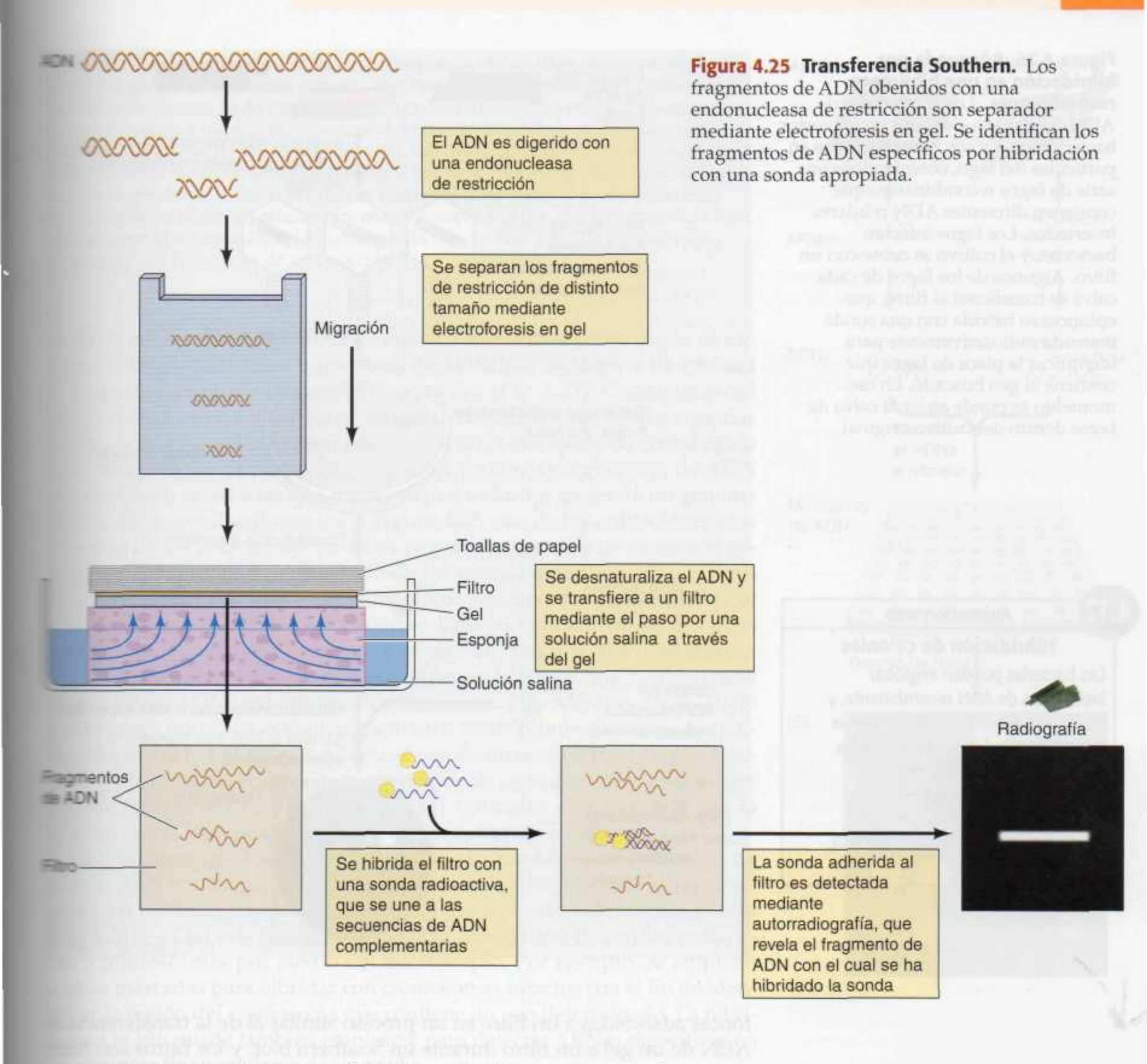


Figura 4.25 Transferencia Southern. Los fragmentos de ADN obenidos con una endonucleasa de restricción son separador mediante electroforesis en gel. Se identifican los fragmentos de ADN específicos por hibridación con una sonda apropiada.

con una sonda clonada. La transferencia de Northern se usa con frecuencia en estudios sobre expresión génica —por ejemplo para determinar la presencia de ARNm específicos en distintos tipos celulares.

La hibridación de ácidos nucleicos también puede emplearse para identificar clones moleculares que contienen insertos específicos de ADN celular. El primer paso en el aislamiento tanto de ADN genómico o de clones de ADNc es frecuentemente la preparación de **bibliotecas de ADN recombinante** —colecciones de clones que contienen todas las secuencias genómicas o de ARNm de un tipo celular concreto (Fig. 4.26)—. Por ejemplo, una biblioteca de ADN humano genómico puede prepararse clonando fragmentos aleatorios de ADN de unas 15 kb en un vector λ. Puesto que el genoma humano es de aproximadamente 3 millones de kb, el genoma humano completo estaría representado por una colección de aproximadamente 500.000 clones de este tipo. Cualquier gen para el que haya un cebador disponible puede ser aislado a partir de una biblioteca recombinante de este tipo. Los fagos recombinantes son sembrados sobre *E. coli*, y cada fago se replica produciendo una placa de lisis sobre un césped de bacterias. Las placas son en-

4.11 **Animación web**

Southern blot

Los fragmentos de ADN son separados empleando la electroforesis en gel y después –como parte de la técnica del Southern blot– se incuban con una sonda de ADN radiactiva para identificar los fragmentos de ADN específicos.

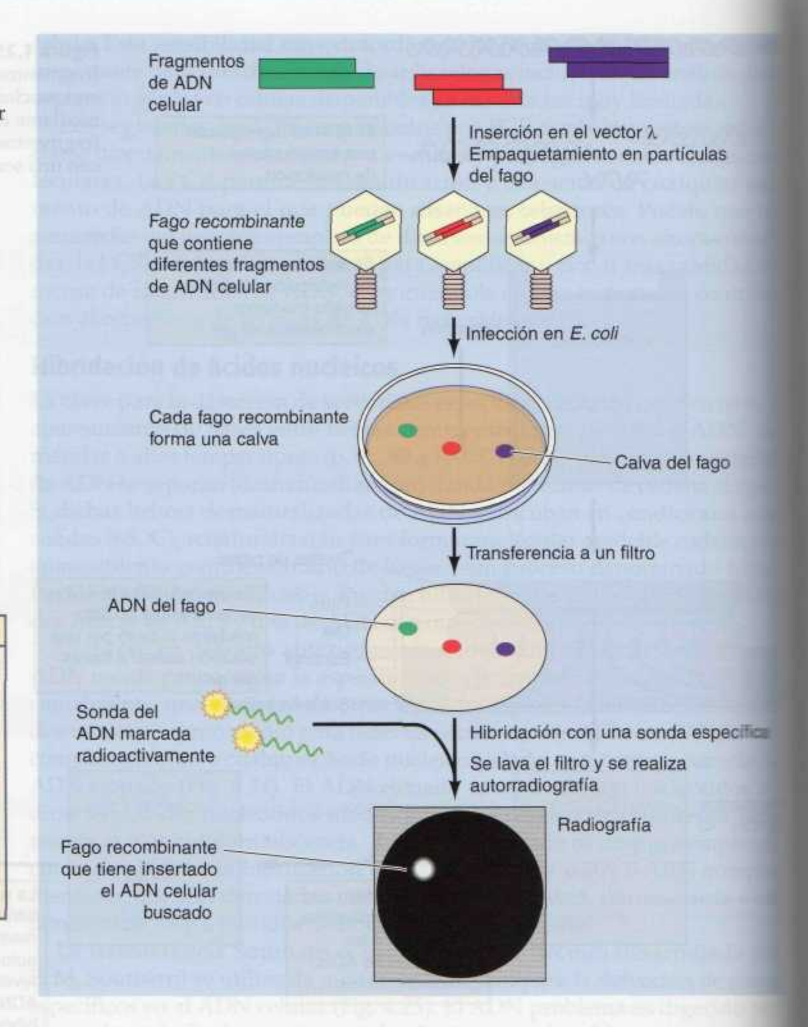


Figura 4.26 Búsqueda por hibridación en una biblioteca recombinante. Los fragmentos de ADN celular son clonados en un vector bacteriófago λ y son empaquetados en partículas del fago, obteniéndose una serie de fagos recombinantes que contienen diferentes ADN celulares insertados. Los fagos infectan bacterias, y el cultivo se cubre con un filtro. Algunos de los fagos de cada calva se transfieren al filtro, que entonces se hibrida con una sonda marcada radioactivamente para identificar la placa de fagos que contiene el gen buscado. En ese momento se puede aislar la calva de fagos dentro del cultivo original.

> **4.12 Animación web**
>
> **Hibridación de colonias**
>
> Las bacterias pueden englobar bibliotecas de ADN recombinante, y moléculas específicas de ADN de la biblioteca pueden ser identificadas mediante el procedimiento de hibridación de colonias –un procedimiento en el que el ADN se incuba con una sonda específica de ADN.

tonces adsorbidas a un filtro en un proceso similar al de la transferencia de ADN de un gel a un filtro durante un Southern blot, y los filtros son hibridados con una sonda marcada para identificar las placas de fagos que contienen el gen de interés. Una variedad de sondas pueden ser empleadas para estos experimentos. Por ejemplo, un clon de ADNc puede emplearse como sonda para aislar el clon genómico correspondiente, o un gen clonado de una especie (p. ej., de ratón) puede emplearse para aislar un gen relacionado de otra especie diferente (p. ej., humano). La placa adecuada puede entonces ser aislada a partir de la placa original para propagar el fago recombinante que porta el inserto de ADN celular de interés. Procedimientos similares pueden usarse para analizar colonias bacterianas que portan clones de ADN plasmídico, de forma que pueden aislarse clones específicos mediante la hibridación tanto de librerías de fagos como plasmídicas.

En lugar de analizar un gen cada vez, como en la transferencia Southern o Northern, la hibridación a **microarrays de ADN** permite el análisis simultáneo de miles de genes. A medida que se han hecho disponibles las secuencias completas de genomas eucarióticos, la hibridación a microarrays de ADN ha permitido a los investigadores realizar análisis globales de secuencias presentes en muestras celulares de ADN o ARN. Un microarray

Figura 4.27 Microarrays de ADN. (A) Un ejemplo del análisis comparativo de la expresión génica entre células cancerosas y normales se emplea como molde para la síntesis de sondas de ADNc marcadas con diferentes colorantes fluorescentes (p. ej., una sonda fluorescente roja para el ADNc de una célula cancerosa y una verde para el ADNc de una célula normal). Las dos sondas de ADNc se mezclan y se hibridan con un microarray de ADN que contiene puntos de oligonucleótidos que corresponden a 10.000 o más genes humanos diferentes. El nivel relativo de expresión de cada gen en células cancerosas comparado con células normales viene indicado por la relación entre la fluorescencia roja y verde en cada posición del microarray. (B) Fotografía de una porción de un microarray.

(A) Célula cancerosa
Célula normal
ARNm
ADNc
Mezclar el ADNc e hibridar
Microarray de ADN
Barrido de láser
(B)

de ADN consiste en una lámina de cristal o membrana sobre la que se imprimen oligonucleótidos o fragmentos de ADNc por un sistema de robótica en pequeños puntos a una elevada densidad (Fig. 4.27). Cada punto del array consiste en un solo oligonucleótido o ADNc. Más de 10.000 secuencias únicas de ADN pueden ser impresas sobre un portaobjetos de cristal típico para microscopia, de modo que es posible producir microarrays de ADN que contienen secuencias que representan a todos los genes de un genoma celular. Tal y como se ilustra en la Figura 4.27, una de las aplicaciones más comunes de los microarrays de ADN es para los estudios de expresión génica; por ejemplo, una comparación de los genes expresados por dos tipos de células diferentes. En un experimento de este tipo, las sondas de ADNc se sintetizan a partir de los ARNm expresados en cada uno de los dos tipos celulares (p. ej., células cancerosas y normales). Los dos ADNc se marcan con colorantes fluorescentes diferentes (generalmente rojo y verde), y una mezcla de los ADNc se hibrida con un microarray de ADN en el que 10.000 o más genes humanos están representados como puntos aislados. A continuación se analiza el array mediante el uso de un escáner láser de alta resolución, y la cantidad relativa de transcripción de cada gen en las células cancerosas comparada con la de las células normales está indicada por la relación entre fluorescencia roja y verde en cada punto del array.

La hibridación de ácidos nucleicos se emplea para detectar secuencias de ADN o ARN homólogas no sólo en extractos celulares, sino también en cromosomas o células intactas —un proceso denominado **hibridación *in situ*** (Fig. 4.28)—. Con esta técnica se analiza la hibridación de sondas radiactivas o fluorescentes por medio del microscopio. Por ejemplo, se emplean sondas marcadas para hibridar con cromosomas intactos con el fin de identificar la región del cromosoma que contiene un gen determinado. La hibridación *in situ* puede también emplearse para detectar ARNm específicos en los distintos tipos celulares de un tejido.

Sondas de anticuerpos para proteínas

Los estudios acerca de la expresión y función génica requieren no sólo la detección de ADN y ARN, sino también de proteínas específicas. En dichos estudios los **anticuerpos** ocupan el lugar de las sondas de ácidos nucleicos como reactantes que interaccionan de modo selectivo con moléculas proteínicas. Los anticuerpos son proteínas sintetizadas por determinadas células del sistema inmune (los linfocitos B) que reaccionan con moléculas que el organismo huésped ha reconocido como exógenas (**antígenos**) —por ejemplo, la cubierta proteínica de un virus—. Los sistemas inmunes de los vertebrados son capaces de sintetizar millones de anticuerpos diferentes, cada uno



Figura 4.28 Hibridación *in situ* por fluorescencia. Hibridación de los cromosomas humanos con sondas fluorescentes específicas para los cromosomas, que marcan cada uno de los 24 cromosomas de un color diferente. (Cortesía de Thomas Reid y Hesed Padilla-Nash, National Cancer Institute).

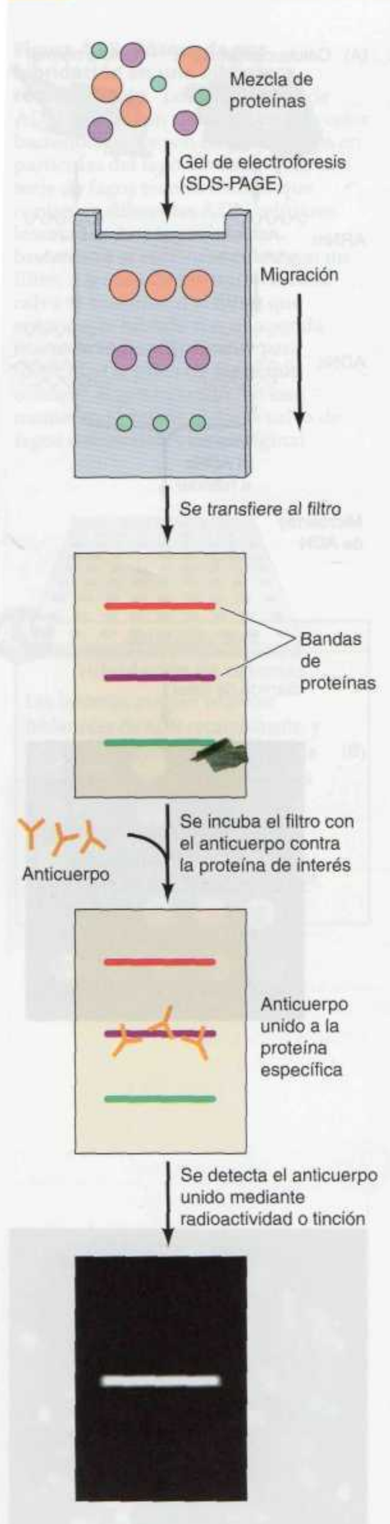


Figura 4.29 Transferencia Western. Se separan las proteínas según su tamaño por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y se transfieren desde el gel a un filtro. Se incuba el filtro con un anticuerpo dirigido contra la proteína de interés. El anticuerpo unido al filtro se puede detectar mediante la reacción con varios agentes, como una sonda radioactiva que se une al anticuerpo.

de los cuales reconoce de forma específica un antígeno en particular, que puede ser una proteína, un hidrato de carbono o una molécula no biológica. Cada linfocito produce un único tipo de anticuerpo, pero los genes responsables de la codificación de anticuerpos varían de un linfocito a otro como resultado de un proceso programado de reordenamiento génico que tiene lugar durante el desarrollo del sistema inmune (véase Cap. 6). Esta variación da lugar a un amplio espectro de linfocitos con distintos genes codificantes de anticuerpos, programados para responder contra distintos antígenos.

Los anticuerpos se generan mediante la inoculación de una proteína extraña en un animal. Por ejemplo, frecuentemente se obtienen anticuerpos contra proteínas humanas a partir de conejos. El suero de estos animales inmunizados contiene una mezcla de anticuerpos (producidos por distintos linfocitos) que reaccionan contra zonas distintas del mismo antígeno. Sin embargo, es posible obtener el mismo tipo de anticuerpo (**anticuerpos monoclonales**) cultivando líneas clonales de linfocitos B de animales inmunizados (habitualmente ratones). Dado que cada linfocito está programado para producir un tipo único de anticuerpo, una línea clonal o clon de linfocitos produce un anticuerpo monoclonal que reconoce un único determinante antigénico, proporcionando un reactante inmunológico de alta especificidad.

Pueden utilizarse otros materiales para producir inmunización y sintetizar anticuerpos, aparte de proteínas celulares purificadas. Por ejemplo, es posible inmunizar animales con células intactas para crear anticuerpos contra proteínas desconocidas expresadas por una línea celular específica (p. ej., una célula neoplásica). Dichos anticuerpos se utilizan para identificar proteínas específicas expresadas por la línea celular utilizada en la inmunización. Es frecuente producir anticuerpos contra proteínas expresadas en bacterias como clones recombinantes. La clonación molecular permite la obtención de anticuerpos dirigidos contra proteínas eucarióticas de difícil aislamiento. También es posible crear anticuerpos contra péptidos sintéticos de entre 10 y 15 aminoácidos, en vez de contra la proteína completa. Por lo tanto, una vez que se conoce la secuencia de un gen, se pueden producir anticuerpos dirigidos contra péptidos que constituyen parte de la secuencia proteínica. Dado que los anticuerpos contra estos péptidos sintéticos habitualmente también reaccionan contra la proteína completa, es posible producir anticuerpos contra una proteína partiendo únicamente de la secuencia de un gen clonado.

Los anticuerpos pueden ser utilizados de distintas maneras para detectar proteínas en extractos celulares. La **inmunotransferencia** (también denominada **transferencia Western** o *Western blotting*) y la **inmunoprecipitación** son dos métodos habituales. La transferencia Western (Fig. 4.29) es otra variación de la transferencia Southern. Las proteínas procedentes de extractos celulares son separadas por electroforesis en gel según su tamaño. Dado que las proteínas tienen formas y cargas eléctricas diferentes, este proceso requiere una modificación del método utilizado para la electroforesis de ácidos nucleicos. Las proteínas se separan por una técnica denominada electroforesis en gel de **SDS-poliacrilamida** (**SDS-PAGE**, *SDS-poliacrylamide gel electroforesis*), en la cual son disueltas en una solución con el detergente dodecil sulfato sódico (SDS), cargado negativamente. Cada proteína se une a muchas moléculas del detergente, que desnaturaliza y da a la prote-

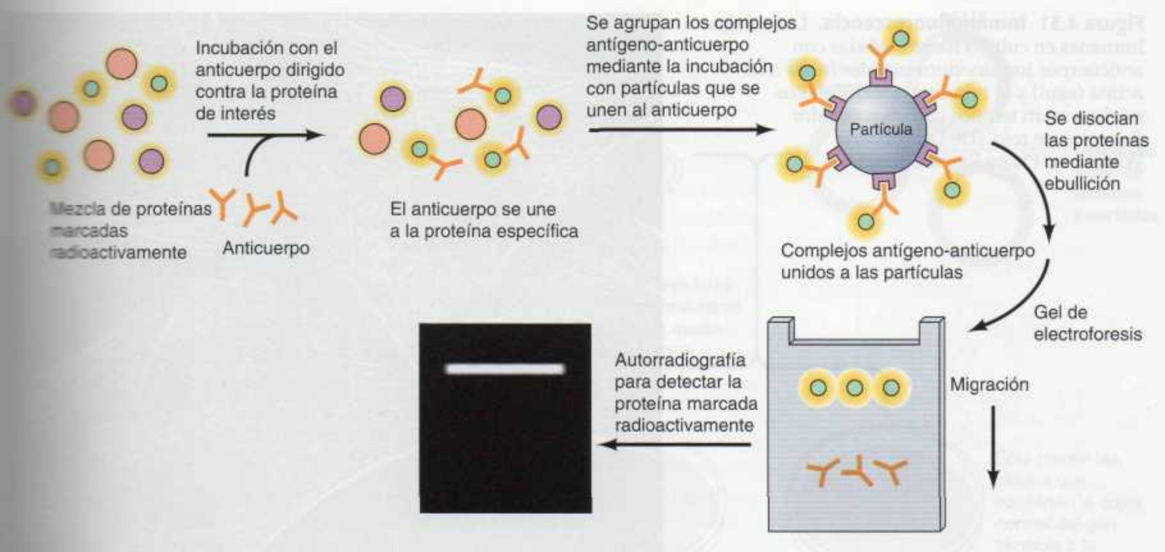


Figura 4.30 Inmunoprecipitación. Se incuban las proteínas marcadas radioactivamente con un anticuerpo, que forma complejos con la proteína contra la cual va dirigida (el antígeno). Estos complejos antígeno-anticuerpo se adhieren a partículas que se unen al anticuerpo. Se hierve el conjunto para disolver los complejos antígeno-anticuerpo, y se analizan las proteínas recuperadas con el gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida. Se detecta la proteína radioactiva que inmunoprecipitó mediante una autorradiografía.

tienen una carga resultante negativa. Bajo estas circunstancias, todas las proteínas migran hacia el electrodo positivo —estando sus tasas de migración únicamente determinadas (como en el caso de los ácidos nucleicos) por el tamaño—. Tras la electroforesis las proteínas se transfieren a un filtro, que se incuba con los anticuerpos que reaccionan con la proteína de interés. El anticuerpo unido al filtro puede ser detectado de varias maneras, como la quimioluminiscencia, identificando de este modo la proteína contra la cual está dirigido el anticuerpo.

En la inmunoprecipitación los anticuerpos son utilizados para aislar las proteínas contra las que reaccionan (Fig. 4.30). Las células son incubadas con aminoácidos radiactivos para marcar sus proteínas. Al extracto celular marcado se le añade un anticuerpo, que se une a su antígeno proteínico diana. Los complejos antígeno-anticuerpo resultantes se aislan y se someten a electroforesis, permitiendo la detección del antígeno radiactivo por autorradiografía.

La inmunoprecipitación también puede emplearse para detectar interacciones proteína-proteína en el interior celular, mediante la co-inmunoprecipitación de dos proteínas que se encuentran interaccionando. Como se describió en el Capítulo 2, una técnica para la identificación de complejos de proteínas es inmunoprecipitar una proteína a partir de células bajo condiciones suaves de modo que permanece asociada con las proteínas con las que normalmente interactúa en el interior celular. Los complejos proteicos inmunoprecipitados pueden ser analizados, por ejemplo, mediante electroforesis en gel y espectrometría de masas, para identificar no sólo la proteína diana a la que estaba dirigida el anticuerpo, sino también otras proteínas con las que se encontraba asociada en el extracto celular.

Como fue expuesto en el Capítulo 1 los anticuerpos pueden ser utilizados para visualizar proteínas en el interior de las células, así como en célu-

4.13 Animación web

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante la inoculación de un animal (como un ratón) con un antígeno, dándole tiempo al animal para que produzca una respuesta inmune, recolectando las células B del animal, y después fusionando las células B con células inmortales de mieloma –creando así hibridomas que pueden ser analizados para la producción de anticuerpos útiles.

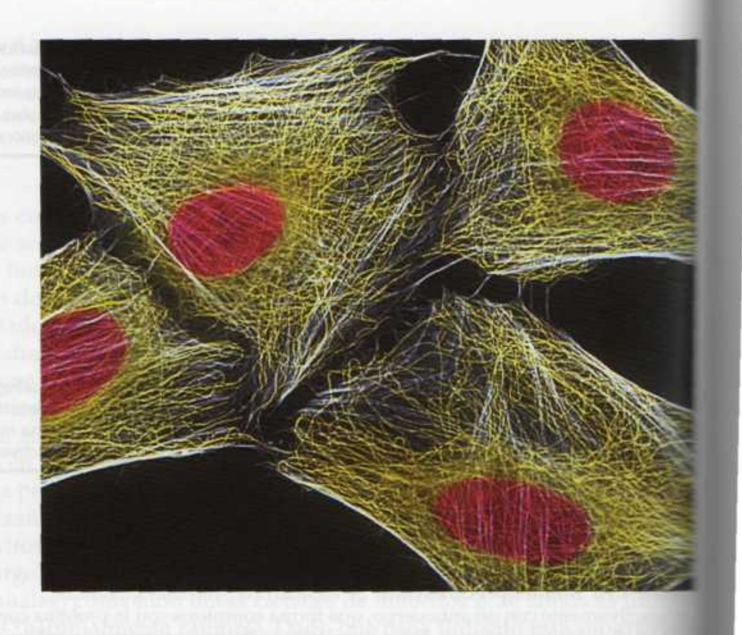


Figura 4.31 Inmunofluorescencia. Las células humanas en cultivo fueron teñidas con anticuerpos inmunofluorescentes frente a la actina (azul) y la tubulina (amarillo). Los núcleos están teñidos con un marcador fluorescente rojo. (De Dr. Torsten Wittmann/Photo Researchers, Inc.)

las lisadas. Las células se tiñen con anticuerpos marcados con pigmen fluorescentes, tras lo cual al ser examinados con el microscopio de fluores- cencia se visualiza la localización subcelular de las proteínas antigéni (véase Fig. 4.31). Los anticuerpos pueden ser etiquetados con marcado visibles al microscopio electrónico, como metales pesados, permitiendo la visualización de antígenos a nivel ultraestructural.

Función de los genes en eucariotas

Las técnicas de ADN recombinante descritas en las secciones previas pro- porcionan poderosas herramientas para el aislamiento y caracterización de- tallada de los genes de las células eucarióticas. Sin embargo para enten la función de un gen es necesario analizarlo formando parte de la célula de un organismo intacto —no simplemente como un clon molecular en una bacteria—. En la genética clásica la función de los genes ha sido puesta de manifiesto por las alteraciones en el fenotipo de los organismos muta La llegada del ADN recombinante ha añadido una nueva dimensión a los estudios sobre la función de los genes, dado que ha hecho posible investi la función de un gen de forma directa reintroduciendo el ADN clonado en una célula eucariótica. En organismos eucarióticos más simples, como las levaduras, esta técnica ha permitido el aislamiento de clones molecu de virtualmente cualquier gen mutado. Existen diversos métodos para in- troducir genes clonados en células animales y vegetales en cultivo, así como en organismos intactos, con el fin de realizar análisis funcionales. Estos avances se pueden complementar con la posibilidad de introducir muta- nes en el ADN clonado *in vitro*, aplicando el poder de las técnicas de ADN recombinante a los estudios funcionales de los genes pertenecientes a euca- riotas más complejos.

Análisis genético en levaduras

Las levaduras son particularmente ventajosas para los estudios de biolo molecular en eucariotas (véase Cap. 1). El genoma de la *Saccharomyces cere- visiae*, que contiene $1{,}2 \times 10^7$ pares de bases, es 200 veces más pequeño que genoma humano. Además, las levaduras se cultivan con facilidad, rep

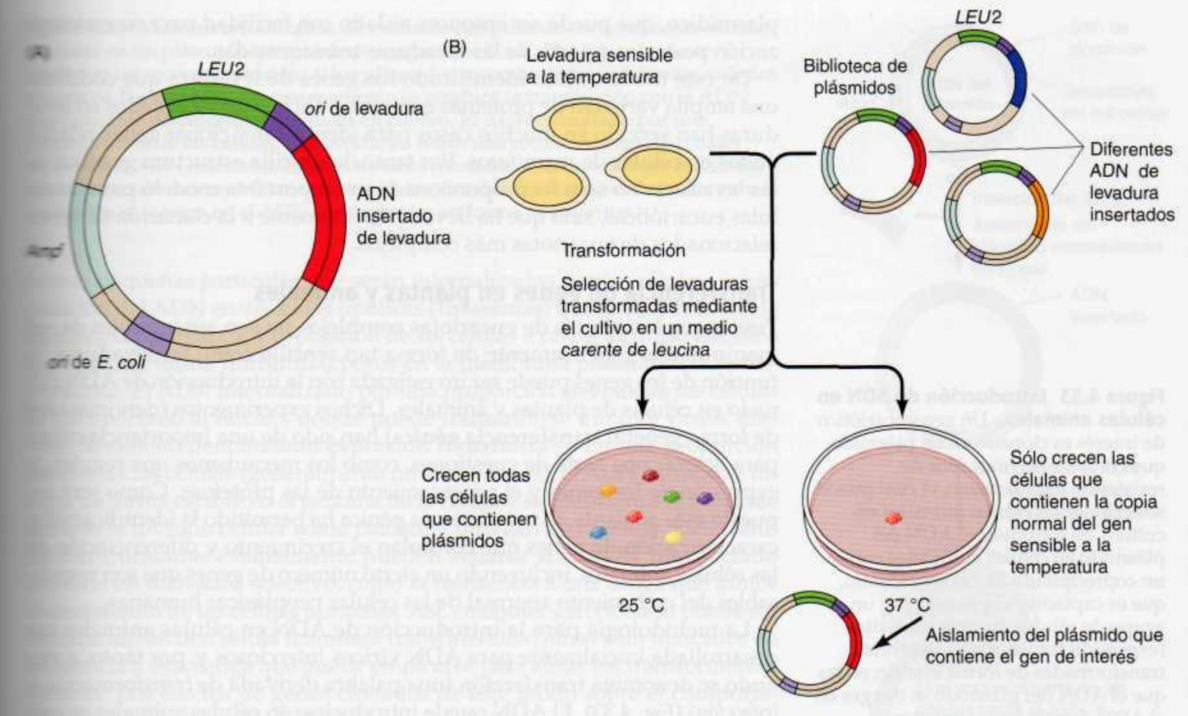
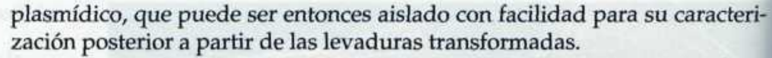


Figura 4.32 Clonación de genes de levaduras. (A) Un vector de levadura. El vector contiene el gen de inicio de la replicación de una bacteria (*ori*) y el de resistencia a la ampicilina (*Amp^r*), permitiendo que se propague como un plásmido en *E.coli*. Además, el vector contiene un gen de inicio de la replicación de levaduras y un gen marcador (*LEU2*), que posibilita la detección de la levadura transformada. El gen *LEU2* codifica una enzima necesaria para la síntesis del aminoácido leucina, de forma que las cepas de levaduras transformadas, que originalmente carecen de esta enzima, pueden detectarse al cultivarse y crecer en un medio sin leucina. (B) Aislamiento de un gen de levadura. Se identifica un gen de interés mediante una mutación sensible a la temperatura, que consiste en que la levadura crezca a 25 °C pero no a 37 °C. Para aislar un clon de este gen se transforman las levaduras sensibles a la temperatura con una biblioteca de plásmidos que contenga una serie de genes que abarquen todo el genoma de las levaduras. Toda levadura transformada por el ADN del plásmido es capaz de crecer en un medio carente de leucina a 25 °C, pero sólo aquellas transformadas por un plásmido que contenga la copia normal del gen de interés son capaces de crecer a una temperatura de 37 °C. Puede aislarse el plásmido deseado a partir de las levaduras transformadas que forman colonias a la temperatura no permisiva.

ciéndose con un tiempo de división de unas 2 horas. Por tanto ofrecen las mismas ventajas básicas —un genoma pequeño y reproducción rápida— que las proporcionadas por las bacterias.

Las mutaciones en las levaduras son tan fácilmente identificables como en *E. coli*. Es sencillo, por ejemplo, aislar una levadura mutante que precise un aminoácido u otro nutriente en particular para crecer. Es posible además aislar levaduras con defectos en genes necesarios para procesos celulares fundamentales (en contraste con los defectos metabólicos) en forma de **mutantes con sensibilidad térmica o termosensibles**. Dichos mutantes codifican proteínas que son funcionales a una determinada temperatura (la temperatura permisiva) pero no a otra (la temperatura no permisiva), mientras que las proteínas normales son funcionales a ambas temperaturas. Una levadura con una mutación con sensibilidad térmica en un gen esencial puede ser identificada por ser únicamente capaz de crecer a la temperatura permisiva. La posibilidad de aislar estos mutantes termo-sensibles ha permitido la identificación de los genes de la levadura que controlan muchos procesos celulares fundamentales, como la síntesis y procesamiento del ARN, la progresión a través del ciclo celular y el transporte de proteínas entre compartimentos celulares.

El relativamente simple sistema genético de las levaduras también permite la clonación de cualquier gen mutado, simplemente basándose en su actividad funcional (Fig. 4.32). En primer lugar se crea una biblioteca genómica de ADN normal de levadura en vectores que se replican como plásmidos en las levaduras de igual forma que en *E. coli*. El pequeño tamaño del genoma de la levadura implica que una biblioteca completa consta de unos pocos miles de plásmidos. Se emplea una mezcla de estos plásmidos para transformar una levadura mutada termo-sensible, y las cepas que son capaces de crecer a la temperatura no permisiva son seleccionadas. Dichas cepas transformadas han adquirido una copia normal del gen buscado en el ADN



plasmídico, que puede ser entonces aislado con facilidad para su caracterización posterior a partir de las levaduras transformadas.

De este modo se han identificado los genes de levadura que codifican una amplia variedad de proteínas esenciales. Dichos genes aislados en levaduras han servido en muchos casos para identificar y clonar genes relacionados en células de mamíferos. Por tanto, la sencilla estructura genética de las levaduras no sólo ha proporcionado un importante modelo para las células eucarióticas, sino que ha llevado directamente a la clonación de genes relacionados de eucariotas más complejos.

Transferencia de genes en plantas y animales

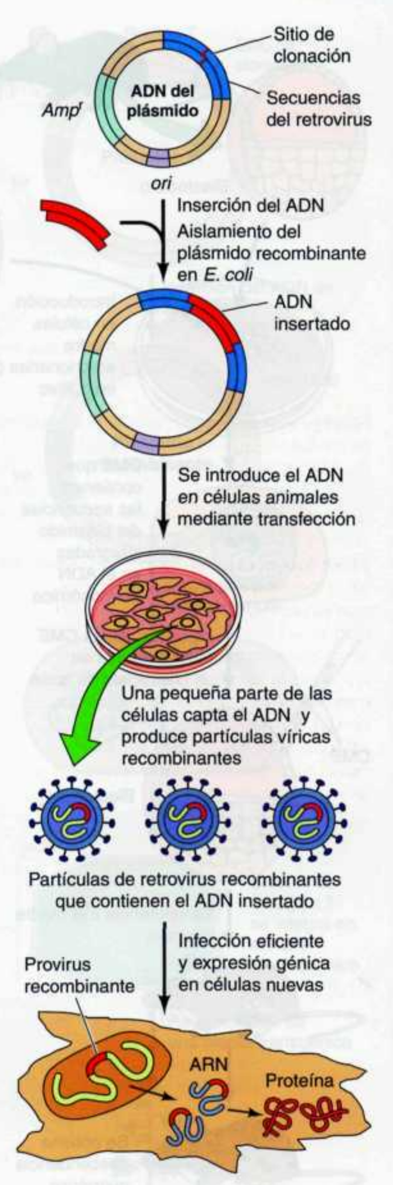
Pese a que las células de eucariotas complejos no son susceptibles de ser manipuladas genéticamente de forma tan sencilla como las levaduras, la función de los genes puede ser investigada con la introducción de ADN clonado en células de plantas y animales. Dichos experimentos (denominados de forma general **transferencia génica**) han sido de una importancia crítica para aclarar una serie de cuestiones, como los mecanismos que regulan la expresión de los genes y el procesamiento de las proteínas. Como será expuesto más adelante, la transferencia génica ha permitido la identificación y caracterización de genes que controlan el crecimiento y diferenciación de las células animales, incluyendo un cierto número de genes que son responsables del crecimiento anormal de las células neoplásicas humanas.

La metodología para la introducción de ADN en células animales fue desarrollada inicialmente para ADN víricos infecciosos y, por tanto, a menudo se denomina **transfección** (una palabra derivada de *trans*formación + in*fección*) (Fig. 4.33). El ADN puede introducirse en células animales en cultivo mediante una variedad de métodos, incluyendo la microinyección directa en el núcleo celular, coprecipitación de ADN con fosfato cálcico para



Figura 4.33 Introducción de ADN en células animales. Un gen eucariótico de interés es clonado en un plásmido que contiene un marcador de resistencia a un fármaco, el cual puede seleccionar las células animales en cultivo. Se introduce el ADN del plásmido en células cultivadas como un coprecipitado de calcio y fosfato, que es captado y expresado por un grupo de células durante unos días (expresión transitoria). Las células transformadas de forma estable, en las que el ADN del plásmido se integra en el ADN cromosómico, pueden seleccionarse por su capacidad de crecer en un medio que contenga el fármaco.

Figura 4.34 Vectores retrovirales. El vector se compone de secuencias retrovirales clonadas en un plásmido que puede propagarse en *E.coli*. El ADN extraño se inserta en las secuencias virales, y los plásmidos recombinantes pueden ser aislados a partir de las bacterias. En este momento se produce la transfección con el ADN recombinante de las células animales en cultivo. El ADN es captado por una pequeña parte de las células, que producen retrovirus recombinantes, los cuales contienen el ADN insertado. Estos retrovirus recombinantes pueden ser utilizados para infectar de manera eficaz nuevas células, donde el genoma viral con los genes insertados se integra en el ADN cromosómico en forma de provirus.



formar pequeñas partículas que serán internalizadas por las células, incorporación del ADN en vesículas lipídicas (**liposomas**) que se fusionan con la membrana plasmática, y exposición de las células a un breve pulso eléctrico que abre, de forma transitoria, poros en la membrana plasmática (**electroporación**). El ADN internalizado por una proporción elevada de las células es transportado al núcleo, donde puede transcribirse durante varios días —un fenómeno denominado **expresión transitoria**—. En una proporción inferior de las células (generalmente un 1% o menos), el ADN extraño se integra de forma estable en el genoma de la célula y se transfiere a la progenie durante la división celular como cualquier otro gen de la célula. Estas células transformadas establemente pueden aislarse si el ADN transfectado contiene un marcador selectivo, como la resistencia a una droga que inhibe el crecimiento de las células normales. Así, cualquier gen clonado puede ser introducido en una célula mamífera transfiriéndolo junto a un marcador de resistencia a una droga que puede emplearse para aislar los transformantes estables. Los efectos de genes clonados de este modo sobre el comportamiento celular —por ejemplo, crecimiento o diferenciación celular— pueden entonces analizarse.

Los virus animales también pueden emplearse como vectores para la introducción más eficaz de ADN clonado en células. Los retrovirus son especialmente útiles en este sentido, ya que su ciclo de vida incluye una integración estable del ADN vírico en el genoma de la célula infectada (Fig. 4.34). Como consecuencia, los vectores retrovirales pueden emplearse para introducir eficazmente genes clonados en una variedad de tipos celulares, convirtiéndolos en un vehículo importante para una amplia gama de aplicaciones.

Es también posible introducir genes clonados en la línea germinal de un organismo multicelular, posibilitando su estudio en el contexto de un animal intacto en lugar de en células en cultivo. Por medio de la inyección del ADN clonado en el pronúcleo de un óvulo fertilizado se producen ratones que portan dichos genes extraños (**ratones transgénicos**) (Fig. 4.35). Los óvulos inyectados se implantan en madres adoptivas y se permite su de-

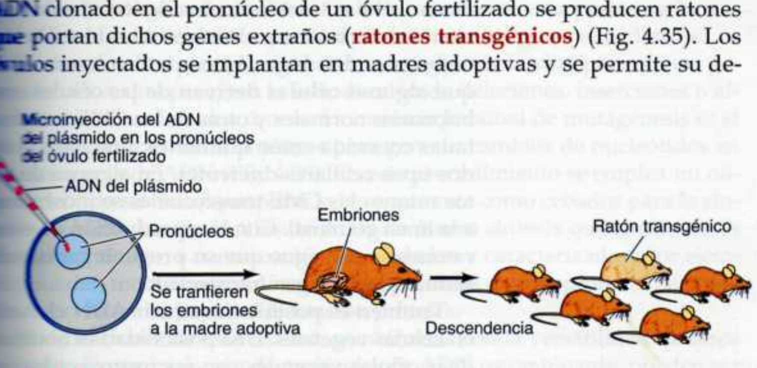


Figura 4.35 Producción de ratones transgénicos. El ADN es inyectado en pronúcleos de un óvulo de ratón fertilizado (los óvulos fertilizados contienen dos pronúcleos, uno del óvulo y otro del esperma). Los óvulos inyectados se transfieren a las madres adoptivas y se permite su desarrollo. Algunos de los descendientes (transgénicos) tienen incorporado en su genoma el ADN inyectado.

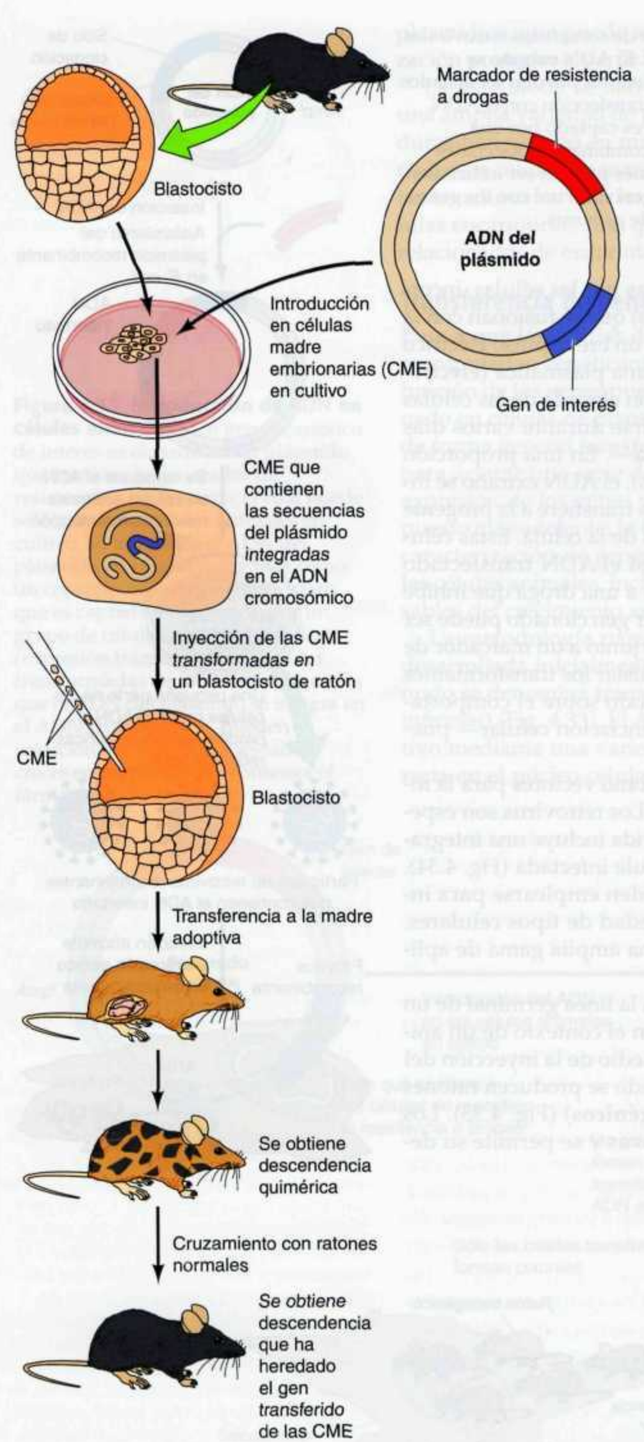


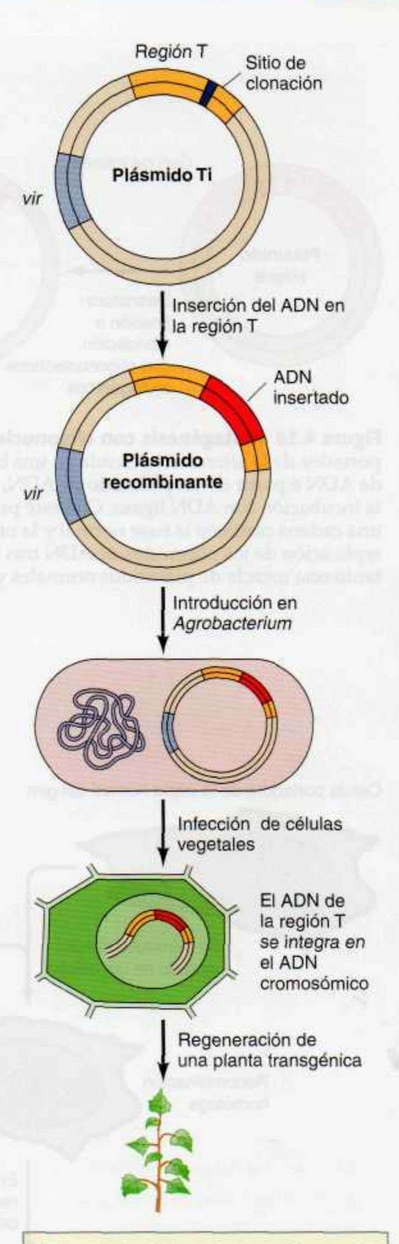
Figura 4.36 Introducción de genes en ratones a través de células madre embrionarias. Las células madre embrionarias son células cultivadas que proceden de embriones tempranos de ratón (*blastocistos*). El ADN es introducido en estas células en cultivo, y posteriormente se aíslan las células madre embrionarias transformadas de forma estable. Se inyectan estas células en un blastocisto receptor, donde son capaces de participar en el desarrollo normal del embrión. Algunos de los ratones hijos que se desarrollan tras la inyección de embriones en madres adoptivas contienen tanto células derivadas de las células madre embrionarias transformadas como células normales del blastocisto. Como estos ratones son mezcla de dos tipos de células diferentes se les denomina quiméricos. Pueden obtenerse descendientes que contengan el gen transfectado cruzando ratones quiméricos, cuyos descendientes tendrán las células madre embrionarias transformadas incorporadas en la estirpe germinal.

sarrollo. En una parte de la progenie (aproximadamente el 10%) el ADN extraño se habrá integrado en el genoma del óvulo fertilizado y estará por tanto presente en todas las células del animal. Dado que el ADN extraño está presente en las células germinales de igual forma que lo está en las somáticas, al reproducirse dicho ADN se transmite a su descendencia como el resto de los genes celulares.

Las propiedades de las **células madre embrionarias (CME)** aportan un medio alternativo para introducir genes clonados en ratones (Fig. 4.36). Las CME pueden obtenerse a partir de embriones tempranos de ratón. Pueden ser reintroducidos en dichos embriones tempranos, donde participan de forma normal en el desarrollo y dan lugar a células en todos los tejidos del ratón —incluidas las células germinales—. Es posible introducir ADN clonado en las CME en cultivo, seleccionar *células transformadas de forma estable* y reintroducirlas en embriones de ratón. Dichos embriones dan lugar a una descendencia en la que algunas células derivan de las células embrionarias normales y otras de las CME transfectadas conocida como quimérica: una mezcla de dos tipos celulares diferentes. En algunos de estos ratones las CME transfectadas se incorporan a la línea germinal. Con la reproducción de estos ratones se consigue que su progenie herede de forma directa el gen transfectado.

También es posible introducir ADN clonado en células vegetales. Una posibilidad es bombardear células vegetales con microproyectiles envueltos en ADN, como pequeñas partículas de tungsteno. Las partículas envueltas en ADN se disparan directamente al interior de las células vegetales; algunas de las células mueren, pero

Figura 4.37 *Introducción de genes en células vegetales por medio del plásmido Ti.* El plásmido Ti contiene la región T, que se transfiere a células vegetales infectadas, y los genes de virulencia (*vir*), que actúan en la transferencia del ADN de la región T. En los vectores plasmídicos Ti, el ADN extraño se inserta en la región T. El plásmido recombinante se introduce en *Agrobacterium tumefaciens*, que se utiliza para infectar células en cultivo. La región T del plásmido (portadora del ADN insertado) es transferida a las células vegetales y se integra en el ADN cromosómico. Puede generarse una planta transgénica a partir de estas células transformadas.



células sobreviven y pasan a estar transformadas de forma estable. Otro vehículo de reciente desarrollo para la introducción de ADN clonado en muchas especies de plantas es un plásmido de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (el **plásmido Ti**) (Fig. 4.37). En la naturaleza *Agrobacterium* se une a las hojas de las plantas y el plásmido Ti se transfiere a las células vegetales, donde se incorpora al ADN cromosómico. Los vectores desarrollados a partir del plásmido Ti proporcionan un medio eficiente para la introducción de ADN recombinante en células vegetales susceptibles. Dado que muchos tipos de plantas pueden regenerarse a partir de una única célula cultivada (véase Cap. 1), las plantas transgénicas se obtienen directamente de células en las que se introduce el ADN recombinante en cultivo —un procedimiento mucho más sencillo que la obtención de animales transgénicos—. Efectivamente, muchos tipos de plantas económicamente importantes, incluidos el maíz, el tomate, la soja y las patatas, son variedades transgénicas.

Mutagénesis de ADN clonados

En los estudios genéticos clásicos (p. ej., en bacterias o levaduras), la clave para identificar los genes y entender su función es la observación del fenotipo alterado de los organismos mutantes. En dichos estudios los genes mutantes son detectados porque producen cambios fenotípicos observables —como por ejemplo crecimiento termosensible o requerimientos nutricionales específicos—. Sin embargo, el aislamiento de genes por técnicas de ADN recombinante ha permitido un enfoque diferente de la mutagénesis. Ahora es posible introducir la alteración que se desee en un gen clonado y determinar el efecto de la mutación en función de los genes. Dichos procedimientos han sido denominados **genética inversa**, dado que en primer lugar se introduce una mutación en un gen y posteriormente se determina su consecuencia. La capacidad de introducir mutaciones específicas en ADN clonados (**mutagénesis *in vitro***) ha demostrado ser una poderosa herramienta en el estudio de la expresión y función de los genes eucarióticos.

Existen muchos procedimientos de mutagénesis *in vitro* para alterar genes clonados, que permiten la introducción de deleciones, inserciones o alteraciones de nucleótidos únicos. Un método habitual de mutagénesis es el uso de oligonucleótidos sintéticos para generar cambios de nucleótidos en una secuencia de ADN (Fig. 4.38). En este procedimiento se emplea un oligonucleótido sintético que porta la base mutante como cebador para la síntesis de ADN. Las moléculas de ADN de nueva síntesis que contienen la mutación pueden, a continuación, ser aisladas y caracterizadas. Por ejemplo, pueden modificarse aminoácidos específicos de una proteína para poder caracterizar su papel en la función proteica.

Modificaciones de esta técnica, combinadas con la versatilidad de otros métodos de manipulación de moléculas de ADN recombinante, pueden ser empleadas para introducir prácticamente cualquier modificación deseada en un gen clonado. Así, el efecto de dichas mutaciones sobre la expresión y función génica puede ser determinado a continuación, mediante la introducción del gen en el tipo celular apropiado. La mutagénesis *in vitro* ha

■ En todo el mundo se cultivan más de 250 millones de acres de cosechas modificadas genéticamente, de las que aproximadamente la mitad se cultiva en Estados Unidos. La primera planta modificada genéticamente que recibió autorización de la FDA para su consumo humano fue el tomate Flavr Savr, que se modificó con el fin de postergar la maduración.

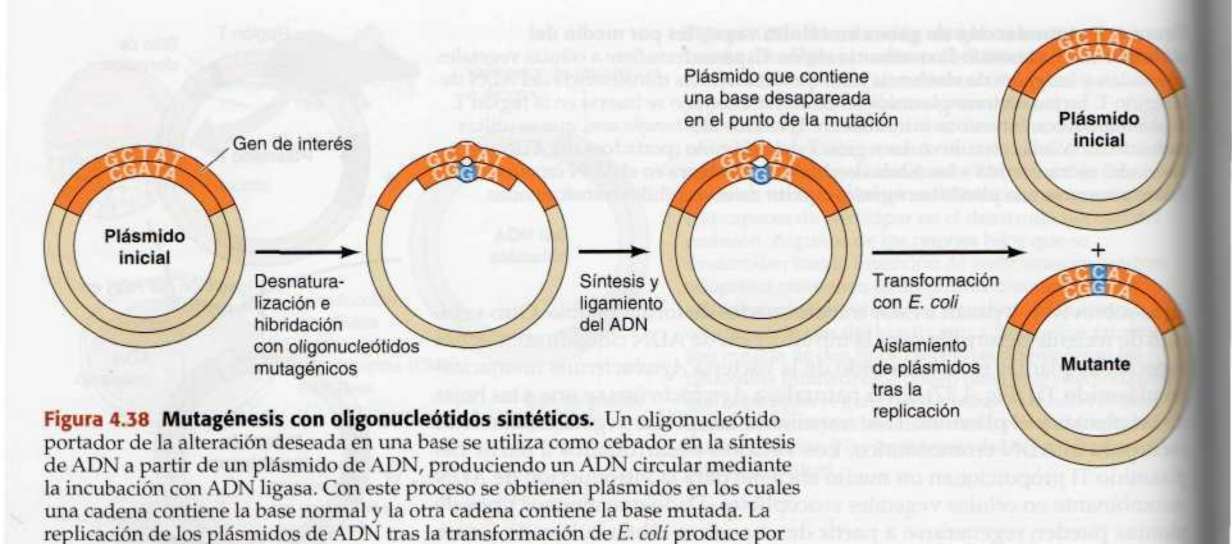


Figura 4.38 Mutagénesis con oligonucleótidos sintéticos. Un oligonucleótido portador de la alteración deseada en una base se utiliza como cebador en la síntesis de ADN a partir de un plásmido de ADN, produciendo un ADN circular mediante la incubación con ADN ligasa. Con este proceso se obtienen plásmidos en los cuales una cadena contiene la base normal y la otra cadena contiene la base mutada. La replicación de los plásmidos de ADN tras la transformación de *E. coli* produce por tanto una mezcla de plásmidos normales y mutantes.

permitido la caracterización en detalle del papel funcional tanto de las secuencias reguladoras como de las codificantes para proteínas de los genes clonados.

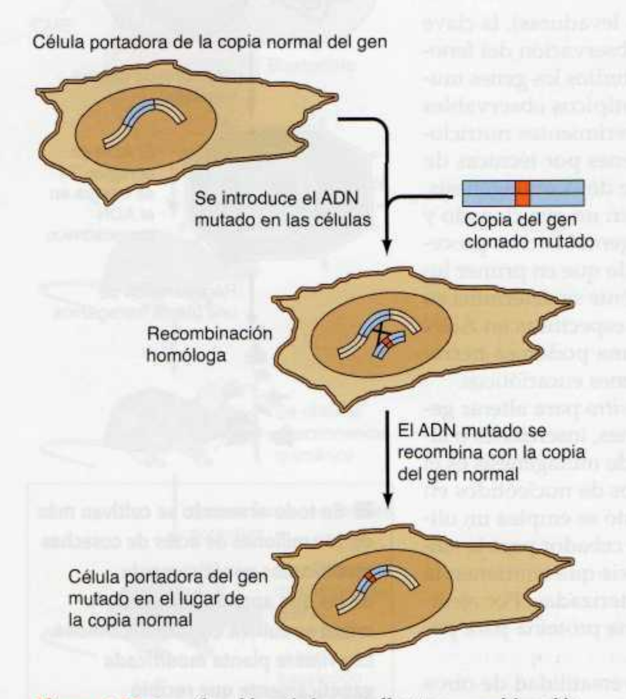


Figura 4.39 Inactivación génica mediante recombinación homóloga. Una copia mutada del gen clonado es introducida dentro de las células. El gen clonado puede sustituir a la copia del gen normal por recombinación homóloga, obteniéndose una célula que transporta la mutación deseada en su ADN cromosómico.

Introducción de mutaciones en genes celulares

Pese a que la transferencia de genes clonados dentro de las células (particularmente en combinación con mutagénesis *in vitro*) proporciona una poderosa herramienta en el estudio de la estructura y función génica, dichos experimentos no son capaces de definir la función de un gen desconocido en una célula u organismo intactos. Las células utilizadas como receptoras de genes clonados poseen copias normales de estos genes en su ADN cromosómico, y estas copias normales continúan realizando sus funciones en las células. Es preciso eliminar la actividad de las copias normales de un gen para determinar su papel biológico. Pueden emplearse diversas técnicas para inactivar las copias cromosómicas de un gen clonado o inhibir la función génica normal, tanto en células en cultivo y en ratones transgénicos.

La mutación de genes cromosómicos se basa en la capacidad de un gen clonado introducido en una célula de sufrir **recombinación homóloga** con su copia cromosómica (Fig. 4.39). En la recombinación homóloga, el gen clonado sustituye al alelo normal, de forma que las mutaciones introducidas en el gen clonado *in vitro* se incorporan en la copia cromosómica del gen. En el caso más sencillo, las mutaciones que inactivan al gen clonado pueden introducirse en lugar de la copia normal del gen para determinar su papel en los procesos celulares.

En células animales la recombinación entre el ADN transferido y su gen homólogo es un hecho poco fre-

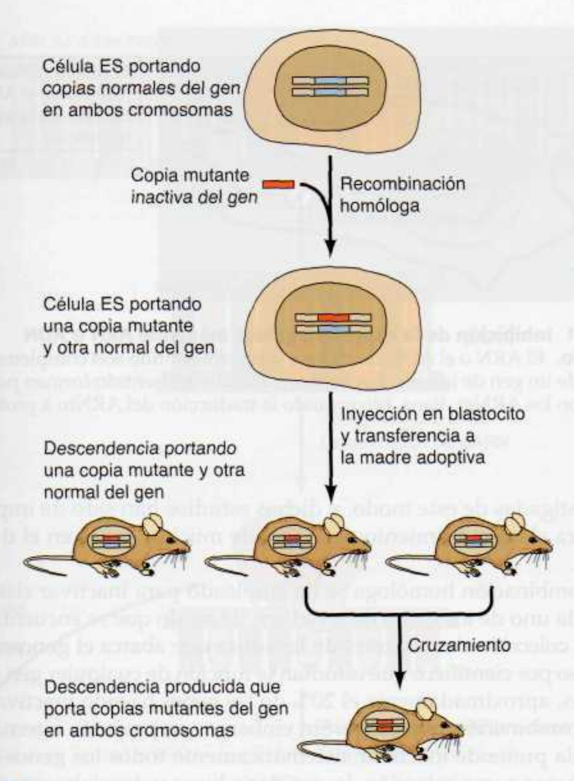
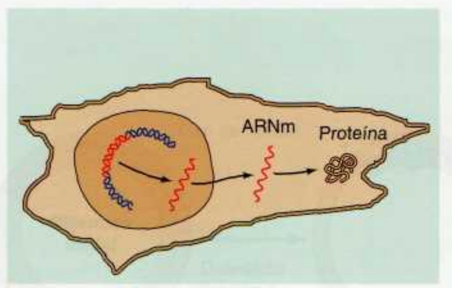


Figura 4.40 Producción de ratones mutantes mediante recombinación homóloga en células madre. La recombinación homóloga se emplea para sustituir un gen normal con una copia mutante inactiva en células madre embriónicas (células ES: *embryonic stem*), resultando en células ES que portan una copia normal y una inactiva del gen en cromosomas homólogos. Estas células ES pueden ser transferidas a blastocistos y empleadas para generar ratones como se describe en la Figura 4.36. Esos ratones, portando una copia mutante y otra normal del gen, pueden entonces cruzarse para producirse descendencia que porta copias mutantes del gen en ambos cromosomas.

mente, por lo que la inactivación de genes por este método es más difícil que en levaduras. Probablemente a causa del mayor tamaño de los genomas de las células de mamífero, la mayor parte del ADN transfectado se integra en el genoma receptor en sitios al azar por recombinación con secuencias no relacionadas. Sin embargo, ha sido posible desarrollar métodos tanto para aumentar la frecuencia de la recombinación homóloga como para seleccionar y aislar las células transformadas en las cuales se ha producido recombinación homóloga, por lo que se pueden inactivar genes en células animales por este procedimiento. Es importante resaltar, que estos genes pueden ser inactivados en las células madre embrionarias en el ratón, y éstas pueden usarse después para generar ratones transgénicos (Fig. 4.40). Estos ratones pueden criarse y generar progenie que contiene copias mutadas del gen diana en ambos cromosomas homólogos, de forma que los efectos de la inactivación de un gen pueden investigarse en el contexto de un animal intacto. Adicionalmente, pueden cultivarse las células obtenidas a partir de embriones de ratón y que contienen copias del gen mutado, de modo que pueden estudiarse las funciones de genes diana en el cultivo celular. Las actividades biológicas de alrededor de 4.000 genes de ratón han



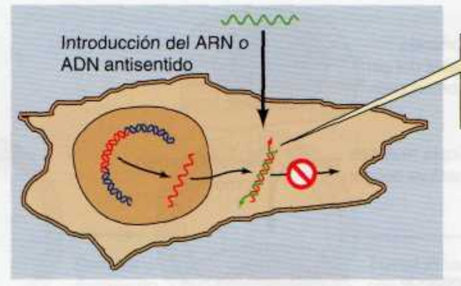


Figura 4.41 Inhibición de la expresión génica mediante ARN o ADN antisentido. El ARN o el ADN de cadena única antisentido son complementarios al ARNm de un gen de interés. Los ácidos nucleicos antisentido forman por tanto híbridos con los ARNm diana, bloqueando la traducción del ARNm a proteína.

sido investigadas de este modo, y dichos estudios han sido de importancia *crítica para el descubrimiento del papel de muchos genes en el desarrollo* del ratón.

La recombinación homóloga se ha empleado para inactivar sistemáticamente cada uno de los genes de levadura, de modo que se encuentra disponible una colección de mutantes de levadura que abarca el genoma entero para su uso por científicos que estudian la función de cualquier gen deseado. En ratones, aproximadamente el 20% de los genes ha sido inactivados mediante recombinación homóloga. Sin embargo, un proyecto internacional a gran escala pretende inactivar sistemáticamente todos los genes de ratón para dar lugar a una colección, lo que daría lugar potencialmente a una colección de ratones mutantes del genoma entero, lo que constituiría una fuente muy importante para aquellos investigadores interesados en el desarrollo y función celular de los mamíferos. También se han desarrollado técnicas para inactivar condicionalmente los genes en tejidos específicos del ratón, *permitiendo estudiar la función de un gen en un tipo celular concreto* (p. ej., en células nerviosas) en lugar de en todas las células del organismo.

Interferencia con la expresión génica celular

Como alternativa a la inactivación mediante recombinación homóloga, pueden emplearse una diversidad de técnicas para interferir específicamente con la expresión o función génica. Un método que se ha empleado para inhibir la expresión de un gen diana deseado es la introducción de **ácidos nucleicos antisentido** en células de cultivo (Fig. 4.41). ARN o ADN monocatenario complementario al ARNm del gen de interés (antisentido) hibrida con el ARNm y bloquea la traducción de la proteína. Adicionalmente, los híbridos ARN-ADN resultantes de la introducción de moléculas de ADN antisentido generalmente son degradados en el interior celular. Los ARN antisentido pueden introducirse directamente en las células, o las células pueden ser transfectadas con vectores que han sido diseñados para expresar ARN antisentido. El ADN antisentido suele estar en forma de oligonucleótidos cortos (de unas 20 bases de longitud), que pueden ser transfectados en las células, o en muchos casos son internalizados por las células directamente desde el medio de cultivo.

En los últimos años, la **interferencia por ARN (ARNi)** ha emergido como un método altamente eficaz y ampliamente utilizado para interferir con la expresión génica a nivel del ARNm. La interferencia por ARN fue descubierta por primera vez en *C. elegans* en 1998, cuando Andrew Fire, Craig Mello y sus colaboradores encontraron que la infección de ARN de

> ■ **Tanto los oligonucleótidos antisentido como el siARN están siendo investigados como potenciales agentes terapéuticos. El oligonucleótido antisentido *fomiversen* ha sido aprobado por la FDA para su uso en el tratamiento de infecciones oculares causadas por un herpesvirus. Un siARN está actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad.**

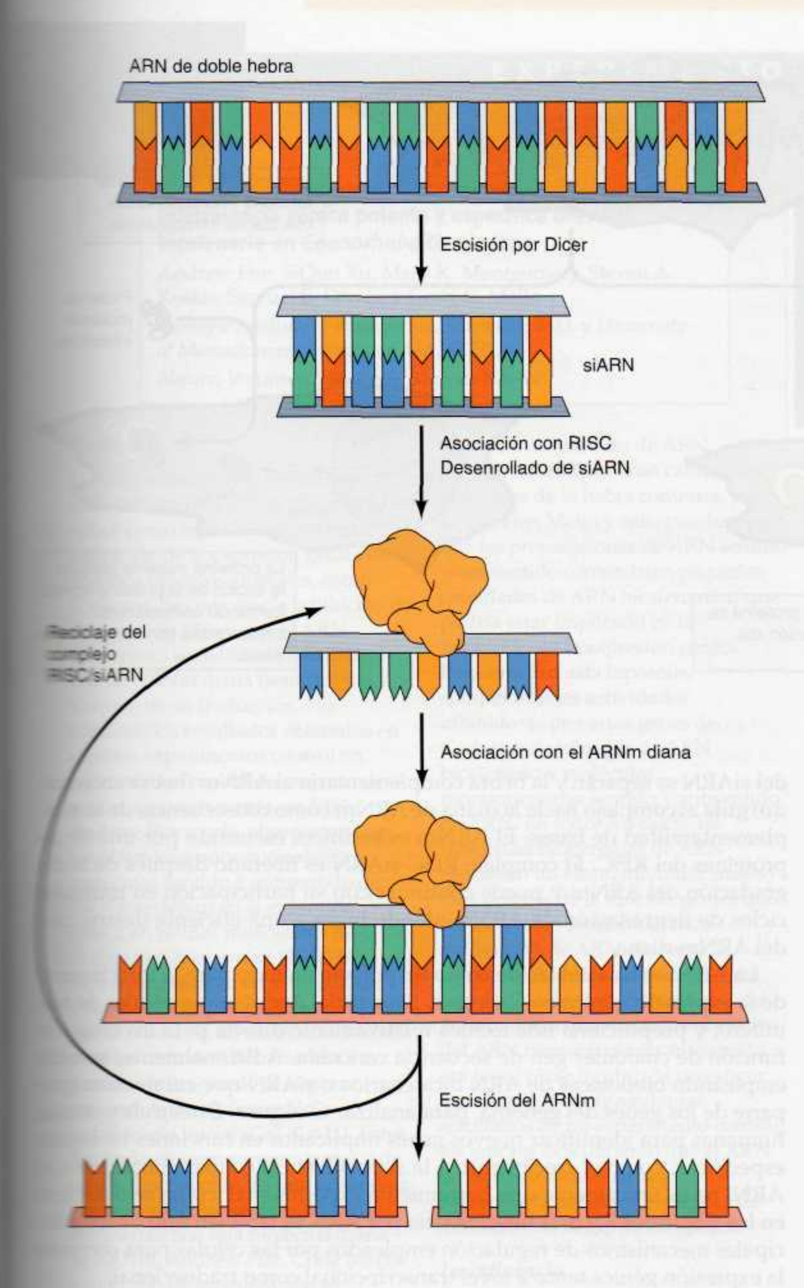


Figura 4.42 Interferencia de ARN. Moléculas de ARN de doble hebra son escindidas por la enzima Dicer en ARN pequeños e interferentes (siRNA: *short interfering RNA*). Los siARN se asocian con el complejo silenciador inducido por RNA (RISC: RNA *induced silencing complex*) y son desenrollados. La hebra antisentido del siARN dirige a RISC a un ARNm homólogo, que es escindido por una de las proteínas RISC. El complejo RISC-siARN es liberado y puede participar en posteriores ciclos de degradación de ARNm.

doble hembra inhibía la expresión de un gen con una secuencia de ARNm complementaria. Esta inesperada observación demostró un papel no anticipado para el ARN de doble hebra en la regulación génica, que fue desarrollado posteriormente para dar lugar a una potente herramienta experimental para inhibir la expresión de genes diana. Cuando los ARN de doble hebra son introducidos en la célula, son escindidos en pequeñas moléculas de doble hebra (21-23 nucleótidos) por una enzima denominada Dicer (Fig. 4.42). Estas moléculas bicatenarias cortas, denominados ARN cortos de interferencia (*short interfering RNAs:* siRNA), se asocian con un complejo de proteínas conocido como el complejo silenciador inducido por ARN (RISC: *RNA-induced silencing complex*). Dentro de este complejo, las dos hebras

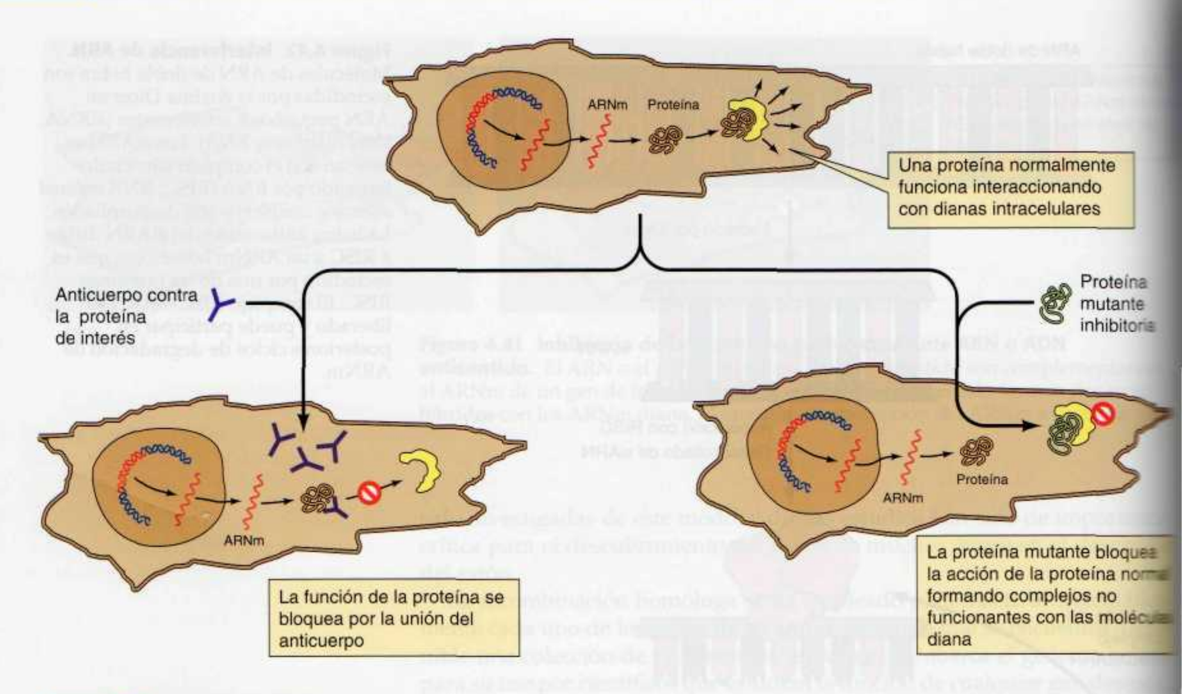


Figura 4.43 Inhibición directa de la función proteínica. Los anticuerpos inyectados pueden unirse a proteínas dentro de las células, inhibiendo por tanto su función normal. Además, algunas proteínas mutantes interfieren con la función de las proteínas normales —por ejemplo, compitiendo con las proteínas normales en la interacción con sus moléculas diana.

del siARN se separan y la hebra complementaria al ARNm (hebra antisentido) guía al complejo hacia la diana de ARNm como consecuencia de la complementareidad de bases. El ARNm es entonces escindido por una de las proteínas del RISC. El complejo RISC-siARN es liberado después de la degradación del ARNm y puede continuar con su participación en múltiples ciclos de degradación de ARNm, dando lugar a una eficiente destrucción del ARNm diana.

La ARNi se ha establecido como un potente método para la interferencia de la expresión génica en *C. elegans, Drosophila, Arabidopsis* y células de mamífero, y proporciona una técnica relativamente directa para investigar la función de cualquier gen de secuencia conocida. Adicionalmente, se están empleando bibliotecas de ARN bicatenarios o siARN que cubren una gran parte de los genes del genoma, para analizar *C. elegans, Drosophila* y células humanas para identificar nuevos genes implicados en funciones biológicas específicas, como el crecimiento o la supervivencia celular. Finalmente, el ARNi no es únicamente una herramienta experimental: como se describirá en los Capítulos 7 y 8, la interferencia por ARN es también uno de los principales mecanismos de regulación empleados por las células para controlar la expresión génica tanto a nivel transcripcional como traduccional.

Además de inactivar un gen o de inducir la degradación de un ARNm, a veces es posible interferir directamente con la función de las proteínas en el interior celular (Fig. 4.43). Una técnica consiste en microinyector anticuerpos que bloquean la actividad de la proteína frente a la que están dirigidos. Alternativamente, algunas proteínas mutantes interfieren con la función de sus homólogos normales cuando se expresan en la misma célula —por ejemplo, compitiendo con la proteína normal por la unión a su molécula diana—. Los ADN clonados que codifican para tales proteínas mutantes (denominadas **mutantes dominantes inhibitorios**) pueden introducirse en las células mediante transferencia génica y ser empleados para estudiar los efectos de bloquear la función génica normal.



EXPERIMENTO CLAVE

Interferencia del ARN

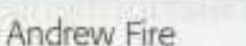
Interferencia génica potente y específica del ARN bicatenario en *Caenorhabditis elegans*

Andrew Fire, SiQun Xu, Mary K. Montgomery, Steven A. Kostas, Samuel E. Driver, y Craig C. Mello

Carnegie Institute of Washington, Baltimore, MD, y University of Massachussets, Worcester, MA. EEUU,

Nature, Volumen 391, 1998, páginas 806-811




Andrew Fire



Craig Mello

Contexto

El ARN antisentido comenzó a utilizarse en 1984 y más adelante se aplicó como método experimental de inhibición de la expresión génica en diversos modelos animales, como *C. elegans*. Se creía que la inhibición de la expresión génica por el ARN antisentido se debía a la hibridación con un ARNm diana (sentido) y el bloqueo de su traducción. No obstante, los resultados obtenidos en algunos experimentos control no concordaban con tal mecanismo de acción. Concretamente, en 1991 Andrew Fire y cols. observaron que los plásmidos que expresaban moléculas sentido y antisentido de ARN interferían en la expresión génica en células musculares de *C. elegans* (*Development* 113:503). De manera similar, en 1995 Su Guo y Kenneth Kemphues comprobaron que la inyección de moléculas sentido y antisentido de ARN afectaba a la función de un gen de *C. elegans* necesario para el desarrollo embrionario inicial (*Cell* 81:611). Estos resultados fueron sorprendentes y de origen desconocido, ya que se suponía que las moléculas sentido de ARN no hibridarían con una molécula diana de ARNm. Andrew Fire, Craig Mello y su grupo de investigación se propusieron estudiar el motivo de esta actividad inesperada del ARN sentido, y en 1998 publicaron el descubrimiento del fenómeno de interferencia del ARN mediado por moléculas bicatenarias de ARN.

Los Experimentos

Cabría esperar que los plásmidos modificados para producir moléculas sentido o antisentido de ARN generaran también unas cantidades reducidas de la hebra contraria, por lo que Fire, Mello y cols. concluyeron que las preparaciones de ARN sentido y antisentido contendrían pequeñas cantidades de ARN bicatenario *cf* que podría estar implicado en la inhibición de la expresión génica. Para estudiar esta hipótesis, compararon las actividades inhibidoras de varios genes de *C. elegans* de híbridos de ARN bicatenario y moléculas monocatenarias sentido y antisentido de ARN. En todos los casos, las moléculas bicatenarias de ARN ejercieron un efecto inhibidor mucho más potente de la función génica que las moléculas monocatenarias antisentido de ARN. Además, la inyección de ARN bicatenario daba lugar a una degradación extensa del ARNm diana, mientras que el efecto del ARN *monocatenario antisentido* era leve (véase figura). Al investigar con detalle los sorprendentes resultados de un experimento control, los autores descubrieron que el ARN bicatenario constituía una herramienta potente y específica de inhibición de la expresión génica.

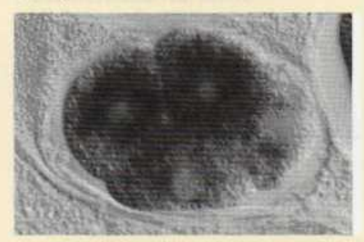
La influencia

El descubrimiento fortuito de la interferencia del ARN no posibilitó únicamente el desarrollo de un nuevo y eficacísimo método experimental de inhibición de la función génica, sino que supuso también una transformación radical de nuestra concepción de los mecanismos de regulación de la expresión génica en las células eucariotas. Las moléculas bicatenarias de ARN son una potente herramienta de experimentación que hoy en día se aprovechan para interferir en la expresión génica en un gran número de modelos experimentales, como los cultivos de células de mamífero. Sin embargo, ha resultado aún más sorprendente el reconocimiento cada vez mayor de las

(A) **Control sin inyección**



(B) **Inyección de ARN antisentido**



(C) **Inyección de ARN bicatenario**



EXPERIMENTO CLAVE

funciones reguladoras que desempeñan habitualmente el ARN bicatenario en las células eucariotas. En su artículo de 1998, Fire y Mello señalaron que «es posible que el mecanismo que sustenta la interferencia del ARN tenga una finalidad biológica. Las células podrían emplear la interferencia genética del ARN bicatenario para llevar a cabo un silenciamiento fisiológico de ciertos genes». Los trabajos realizados posteriormente han logrado confirmar esta predicción y en la actualidad se considera que el ARN bicatenario es uno de los principales reguladores de la expresión génica en las células eucariotas. Se han identificado varios cientos de RNA reguladores que no codifican proteínas (denominados microARN) en los mamíferos y se ha comprobado que la regulación génica ejercida por los microARN juega un papel destacado en diversos procesos celulares, como la señalización celular, la supervivencia celular, el desarrollo cardíaco y cerebral, y el cáncer. A cada microARN le corresponde un gran número de dianas de ARNm y se cree que los microARN intervienen en la regulación de más de 5.000 genes en el ser humano. El descubrimiento de la interferencia del ARN gracias a la obtención de resultados sorprendentes en un experimento control ha revolucionado nuestra comprensión de la regulación génica.

PALABRAS CLAVE / RESUMEN

HERENCIA, GENES Y ADN

gen, alelo, dominante, recesivo, genotipo, fenotipo, cromosoma, diploide, meiosis, haploide, mutación

Genes y cromosomas: Los cromosomas son los portadores de los genes.

hipótesis de un gen-una enzima

Genes y enzimas: Un gen determina la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica.

transformación

Identificación del ADN como material genético: Se identificó el ADN como material genético gracias a experimentos de transformación bacteriana.

Estructura del ADN: El ADN es una doble hélice en la que se forman enlaces de hidrógeno entre las purinas y las pirimidinas de cadenas opuestas. Debido al apareamiento específico de bases —A con T y G con C— las dos cadenas de una molécula de ADN tienen una secuencia complementaria.

replicación semiconservativa, ADN polimerasa

Replicación del ADN: El ADN se replica por un mecanismo semiconservativo, en el que las dos cadenas se separan y cada una sirve de modelo para la síntesis de una nueva cadena hija.

EXPRESIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

Colinearidad entre genes y proteínas: El orden de los nucleótidos en el ADN determina el orden de los aminoácidos en las proteínas.

dogma central, transcripción, traducción, ARN mensajero (ARNm), ARN polimerasa, ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt)

Papel del ARN mensajero: El ARN mensajero funciona como intermediario en el transporte de la información desde el ADN hasta los ribosomas donde se utiliza como molde en la síntesis de proteínas.

código genético, traducción *in vitro*, codón

Código genético: El ARN de transferencia o transferente se utiliza como adaptador entre los aminoácidos y el ARNm durante la síntesis proteica. Cada aminoácido se especifica por un codón que consta de tres nucleótidos.

RESUMEN

Virus ARN y transcripción inversa: Se puede sintetizar el ADN a partir de moldes de ARN, como fue descubierto en los retrovirus en primer lugar.

ADN RECOMBINANTE

Endonucleasas de restricción: Las endonucleasas de restricción cortan secuencias de ADN específicas, obteniéndose fragmentos definidos a partir de moléculas de ADN.

Generación de moléculas de ADN recombinante: Las moléculas de ADN recombinante constan de un fragmento de ADN de interés ligado a un vector que es capaz de replicarse independientemente en una célula huésped apropiada.

Vectores para ADN recombinante: Se utilizan diversos vectores para clonar fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

Secuenciación del ADN: La secuencia de nucleótidos de los fragmentos de ADN clonados se puede determinar fácilmente.

Expresión de los genes clonados: Las proteínas codificadas por los genes clonados pueden expresarse a gran escala tanto en bacterias como en células eucariotas.

DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y PROTEÍNAS

Amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La PCR permite la amplificación y aislamiento de fragmentos específicos de ADN *in vitro*, proporcionando un método sensible para la detección de pequeñas cantidades de moléculas de ADN o ARN específicas.

Hibridación de ácidos nucleicos: La hibridación de ácidos nucleicos permite detectar secuencias concretas de ADN o ARN mediante el apareamiento de bases entre hebras complementarias.

Anticuerpos como sondas para proteínas: los anticuerpos pueden ser utilizados para detectar proteínas específicas en células o extractos celulares.

FUNCIÓN DE LOS GENES EN EUCARIOTAS

Análisis genético en levaduras: La sencillez de su genética y la rápida replicación de las levaduras facilita la clonación molecular de cualquier gen que corresponda a una mutación de la levadura.

Transferencia génica en plantas y animales: Los genes clonados pueden ser introducidos en células eucariotas complejas y en organismos multicelulares para su análisis funcional.

PALABRAS CLAVE

retrovirus, transcripción inversa, transcriptasa inversa

endonucleasas de restricción, electroforesis en gel, mapa de restricción

clonación molecular, vector, molécula recombinante, clon molecular, ligasa de ADN, ADNc

origen de la replicación, cósmido, cromosoma artificial P1 (PAC), cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial de levadura (YAC)

dideoxinucleótido

vector de expresión, doble-híbrido de levaduras

reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

hibridación de ácidos nucleicos, transferencia Southern, transferencia Northern, biblioteca de ADN recombinante, microarrays de ADN, hibridación *in situ*

anticuerpo, antígeno, anticuerpo monoclonal, inmunotransferencia, transferencia Western, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

mutante sensible a la temperatura

transferencia génica, transfección, liposoma, expresión transitoria, electroporación, ratón transgénico, célula madre embrionaria (CME), *plásmido Ti*

PALABRAS CLAVE

genética inversa, mutagénesis *in vitro*

recombinación homóloga, mutante inhibitorio

ácido nucleico antisentido, interferencia del ARN (ARNi), mutante inhibitorio

RESUMEN

Mutagénesis de ADN clonado: La mutagénesis *in vitro* del ADN clonad sirve para estudiar el efecto de las mutaciones en la función génica.

Introducción de mutaciones en genes celulares: Pueden introducirse mu- taciones en las copias de genes cromosómicos mediante la recombinació homóloga con secuencias de ADN clonadas.

Interferir con la expresión génica celular: La expresión o función de ge- nes específicos puede ser bloqueada mediante ácidos nucleicos antisenti- do, interferencia de ARN, o mutantes dominantes inhibitorios.

Preguntas

1. ¿Cómo determinarías si dos genes diferentes están ligados en *Drosophila*?

2. Se crece *E. coli* durante varias generaciones en medio que contiene N^{15}. Las células se transfieren a un medio que contiene N^{14} y crecen durante dos generaciones adicionales. ¿Qué proporción del ADN aislado a partir de estas células será de densidad pesada, ligera o intermedia?

3. La adición o deleción de uno o más nucleótidos en la parte codificante de un gen produce una proteína no funcional, mientras que la adición o deleción de tres nucleótidos a menudo produce una proteína con una función casi normal. Explícalo.

4. Describe las características que debe poseer un cromosoma artificial de levaduras para clonar un fragmento de ADN humano cortado con *Eco*RI en levadura.

5. Está estudiando una enzima en la cual existe un residuo de cisteína activo que está codificado por el triplete UGU. ¿Cómo afectaría a la función enzimática la mutación de la tercera base por una C? ¿Y la mutación por una A?

6. La digestión de una molécula de ADN de 4 kb con *Eco*RI produce dos fragmentos de 1 kb y 3 kb cada uno. La digestión de la misma molécula con *Hin*dIII proporciona fragmentos de 1,5 kb y 2,5 kb. Por último, tras la digestión combinada con *Eco*RI y *Hin*dIII se obtienen fragmentos de 0,5 kb, 1 kb y 2,5 kb. Dibuja el mapa de restricción indicando la posición de los puntos de corte de *Eco*RI y *Hin*dIII.

7. Comenzando con ADN de un solo espermatozoide, ¿cuántas copias de una secuencia génica específica se conseguirán después de 10 ciclos de amplificación con PCR? ¿Y tras 30 ciclos?

8. Has clonado un fragmento de AD genómico humano en un vector cos- dico; aproximadamente cuántas ve esperarías que el inserto sea cortado p una enzima de restricción *Bam*HI?

9. ¿Cuál es el número mínimo de clo BAC necesarios para construir una b- blioteca genómica de ADN humano?

10. ¿Cómo esperarías que la actinom na D afecte a la replicación del virus d la gripe?

11. ¿Cuál es la característica crítica de u vector de clonación que te permitir aislar células de mamíferos transfect- das de forma estable?

12. Los ácidos nucleicos tienen una ca- ga neta negativa y pueden separa mediante electroforesis en gel en base su tamaño. Por el contrario, distint proteínas tienen diferentes carga ¿Cómo, entonces, pueden separa proteínas en función de su tamaño me- diante electroforesis?

Bibliografía

Herencia, genes y ADN

Avery, O. T., C. M. MacLeod and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79: 137–158. [P]

Franklin, R. E. and R. G. Gosling. 1953. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171: 740–741. [P]

Kornberg, A. 1960. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 131: 1503–1508. [P]

Kresge, N., R. D. Simoni and R. L. Hill. 2005. Launching the age of biochemical genetics, with *Neurospora*: The work of George Wells Beadle. *J. Biol. Chem.* 280: e9–e11. [R]

Lehman, I. R. 2003. Discovery of DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 278: 34733–34738. [R]

Meselson, M. and F. W. Stahl. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44: 671–682. [P]

Watson, J. D. and F. H. C. Crick. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 964–967. [P]

Watson, J. D. and F. H. C. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737–738. [P]

Wilkins, M. H. F., A. R. Stokes and H. R. Wilson. 1953. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* 171: 738–740. [P]

Expresión de la información genét

Baltimore, D. 1970. RNA-dependent D polymerase in virions of RNA tum viruses. *Nature* 226: 1209–1211. [P]

Brenner, S., F. Jacob and M. Meselson. 1 An unstable intermediate carrying in mation from genes to ribosomes for p tein synthesis. *Nature* 190: 576–581. [P]

Crick, F. H. C., L. Barnett, S. Brenner and R. Watts-Tobin. 1961. General nature of th genetic code for proteins. *Nature* 1 1227–1232. [P]

Ingram, V. M. 1957. Gene mutations in hu man hemoglobin: The chemical differe between normal and sickle cell hemog bin. *Nature* 180: 326–328. [P]

Nirenberg, M. 2004. Historical review: Deciphering the genetic code—a personal account. *Trends Biochem. Sci.* 29: 46–54. [R]

Nirenberg, M. and P. Leder. 1964. RNA codewords and protein synthesis. *Science* 145: 1399–1407. [P]

Nirenberg, M. W. and J. H. Matthaei. 1961. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 1588–1602. [P]

Temin, H. M. and S. Mizutani. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211–1213. [P]

Yanofsky, C. 2007. Establishing the triplet nature of the genetic code. *Cell* 128: 815–818. [R]

Yanofsky, C., B. C. Carlton, J. R. Guest, D. R. Helinski and U. Henning. 1964. On the colinearity of gene structure and protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51: 266–272. [P]

ADN recombinante

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. eds. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing and Wiley Interscience.

Burke, D. T., G. F. Carle and M. V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806–812. [P]

Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, H. W. Boyer and R. B. Helling. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240–3244. [P]

Nathans, D. and H. O. Smith. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 273–293. [R]

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491. [P]

Sambrook, J. and D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463–5467. [P]

Detección de ácidos nucleicos y proteínas

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. eds. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing and Wiley Interscience.

Brown, P. O. and D. Botstein. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genet.* 21: 33–37. [R]

Caruthers, M. H. 1985. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science* 230: 281–285. [R]

Gerhold, D., T. Rushmore and C. T. Caskey. 1999. DNA chips: Promising toys have become powerful tools. *Trends Biochem. Sci.* 24: 168–173. [R]

Grunstein, M. and D. S. Hogness. 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3961–3965. [P]

Harlow, E. and D. Lane. 1999. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495–497. [P]

Sambrook, J., and D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503–517. [P]

Función de los genes en eucariotas

Boutros, M., A. A. Kiger, S. Armknecht, K. Kerr, M. Hild, B. Koch, S. A. Haas, Heidelberg Fly Array Consortium, R. Paro and N. Perrimon. 2004. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* 303: 832–835. [P]

Branda, C. S. and S. M. Dymecki. 2004. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Devel. Cell* 6: 7–28. [R]

Bronson, S. K. and O. Smithies. 1994. Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 269: 27155–27158. [R]

Capecchi, M. R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288–1292. [R]

Carpenter, A. E. and D. M. Sabatini. 2004. Systematic genome-wide screens of gene function. *Nature Rev. Genet.* 5: 11–22. [R]

Downward, J. 2004. Use of RNA interference libraries to investigate oncogenic signaling in mammalian cells. *Oncogene* 23: 8376–8383. [R]

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811. [P]

Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 67: 16–37. [R]

Herskowitz, I. 1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329: 219–222. [R]

Izant, J. G. and H. Weintraub. 1984. Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36: 1007–1015. [P]

Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet and K. Rajewsky. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427–1429. [P]

Mello, C. C. and D. Conte Jr. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431: 338–342. [R]

Nilsen, T.W. 2007. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 23:243–249. [R]

Novina, C. D. and P. A. Sharp. 2004. The RNAi revolution. *Nature* 430: 161–164. [R]

Palmiter, R. D. and R. L. Brinster. 1986. Germline transformation of mice. *Ann. Rev. Genet.* 20: 465–499. [R]

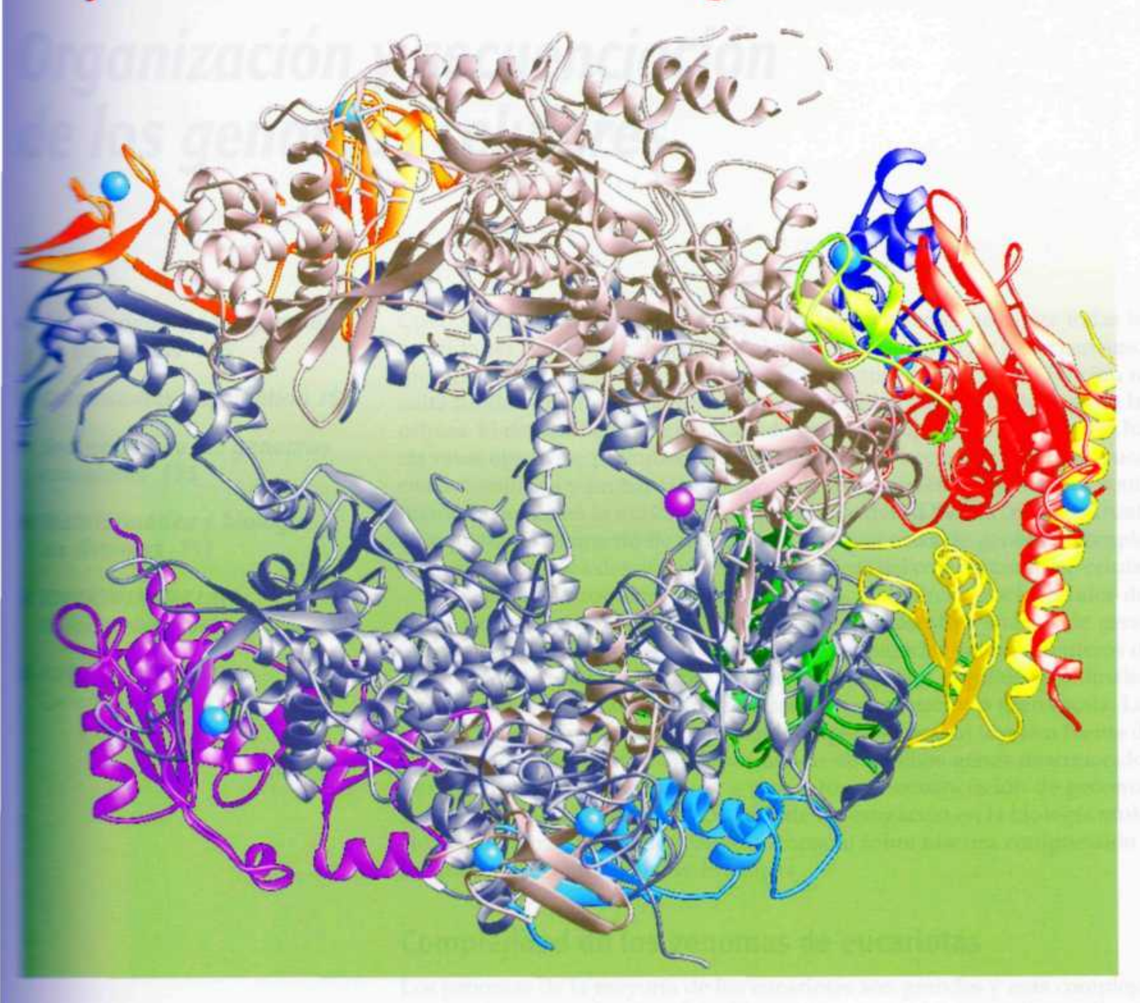
Smith, M. 1985. *In vitro* mutagenesis. *Ann. Rev. Genet.* 19: 423–462. [R]

Struhl, K. 1983. The new yeast genetics. *Nature* 305: 391–397. [R]

The International Knockout Mouse Consortium. 2007. A mouse for all reasons. *Cell* 128: 9–13. [R]

SECCIÓN II

Flujo de la información genética



CAPÍTULO 5

Organización y secuenciación de los genomas celulares

COMO MATERIAL GENÉTICO, EL ADN PROPORCIONA UN PATRÓN que dirige todas las actividades celulares y determina el plan de desarrollo de los organismos multicelulares. Por lo tanto, entender la estructura genética y su función resulta fundamental para obtener una visión de la biología molecular de las células. El desarrollo de la clonación de genes ha supuesto un gran paso hacia estos objetivos, permitiendo a los científicos diseccionar genomas eucariotas complejos y probar las funciones de los genes eucarióticos. Los continuados avances en la tecnología recombinante del ADN nos conducen hasta el inquietante momento de determinar las secuencias de genomas completos, acercándonos a descifrar las bases genéticas del comportamiento celular.

Tal y como se comentó en el Capítulo 4, las aplicaciones iniciales del ADN recombinante estuvieron dirigidas al aislamiento y análisis de genes individuales. Recientemente, se ha logrado secuenciar genomas enteros de cientos de bacterias, levaduras y numerosas especies vegetales y animales, incluyendo al ser humano, en proyectos de secuenciación a gran escala. Las secuencias de estos genomas celulares completos aportan una rica fuente de información, incluyendo la identificación de muchos genes desconocidos hasta ahora. El resultado de estos proyectos de secuenciación de genomas se espera que estimulen muchos años de investigación en la biología molecular y celular, y tener un profundo impacto sobre nuestra comprensión y tratamiento de enfermedades humanas.

Complejidad de los genomas de eucariotas

Los genomas de la mayoría de los eucariotas son grandes y más complejos que los de procariotas (Fig. 5.1). El gran tamaño de los genomas eucariotas no resulta sorprendente, puesto que uno debe esperar encontrar más genes en organismos que son más complejos. Sin embargo, el tamaño del genoma de muchos eucariotas no parece estar relacionado con la complejidad genética. Por ejemplo, los genomas de las salamandras y lirios contienen diez veces más cantidad de ADN que la encontrada en el genoma humano, y estos organismos no son diez veces más complejos que los humanos.

Esta aparente paradoja se resolvió por el descubrimiento de que los genomas de la mayoría de las células eucariotas contienen no solo genes funcionales sino también grandes cantidades de secuencias de ADN que no codifican proteínas. La diferencia de tamaños entre los genomas de la salamandra y del hombre refleja grandes cantidades de ADN no codifican-

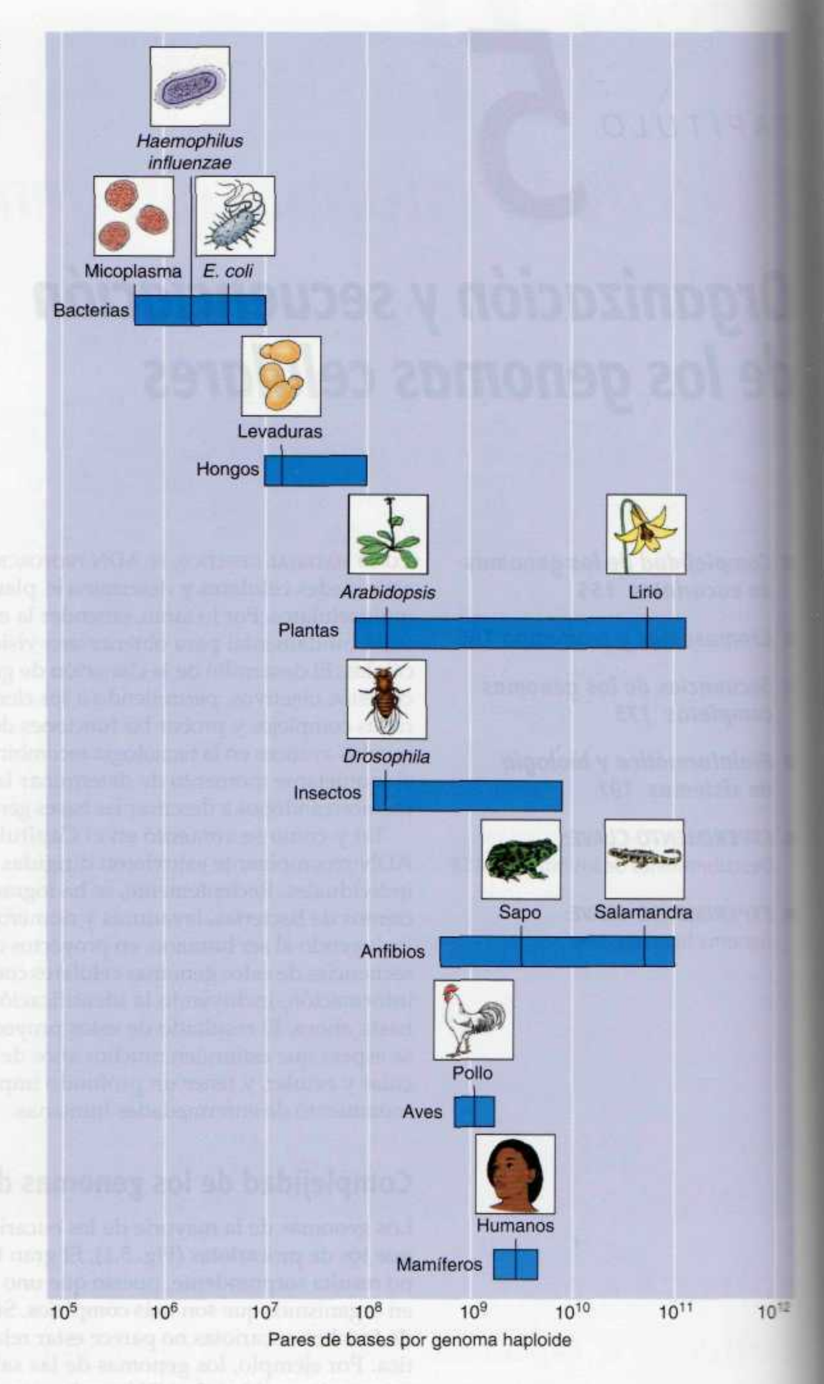


Figura 5.1 Tamaño del genoma. La variedad de tamaños de los genomas de los grupos representativos de organismos se muestra en una escala logarítmica.

te, en lugar de más genes, en el genoma de la salamandra. La presencia de grandes cantidades de secuencias no codificantes es una propiedad universal de los genomas de los eucariotas complejos. Por tanto, el hecho de que el genoma humano es mil veces mayor en comparación con el de *E. coli* no solo se debe a un gran número de genes. Se cree que el genoma humano contiene aproximadamente 20.000-25.000 genes —alrededor de 5 veces más

de los que contiene *E. coli*—. Gran parte de la complejidad de los eucariotas humanos resulta de la abundancia de varios tipos diferentes de secuencias no codificantes, que constituyen la mayoría del ADN de las células eucariotas superiores.

Intrones y exones

En términos moleculares, un **gen** puede definirse como un segmento de ADN que se expresa para dar un producto funcional, que puede ser un ARN (p. ej., ribosómico y transferente) o un polipéptido. Algunos ADN no codificantes en eucariotas representan largas secuencias de ADN que residen entre genes (**secuencias espaciadoras**). Sin embargo, también se encuentran grandes cantidades de ADN no codificante dentro de la mayoría de los genes eucariotas. Tales genes presentan una estructura dividida en la que los segmentos de secuencia codificante (llamados **exones**) están separados por secuencias no codificantes (secuencias intermedias, o **intrones**) (Fig. 5.2). El gen completo se transcribe para producir una molécula larga de ARN en la que los intrones se han retirado mediante *splicing* o empalmes, por lo que solo los exones se encuentran incluidos en el ARNm.

Los intrones se descubrieron por primera vez en 1977, en los laboratorios de Phillip Sharp y Richard Roberts independientemente, durante el estudio de la replicación de los adenovirus en cultivos de células humanas. Los adenovirus resultan ser un modelo útil para el estudio de la expresión génica, debido a que el genoma viral ocupa alrededor de $3,5 \times 10^4$ pares de bases y porque los ARNm de los adenovirus se producen a niveles muy altos en las células infectadas. Uno de los métodos para describir los ARNm de los adenovirus consistió en determinar las localizaciones de los correspondientes genes virales mediante el examen de los híbridos de ARN-ADN en el microscopio electrónico. Debido a que los híbridos de ARN-ADN se distinguen de los ADN de una sola hebra, es posible determinar las posiciones de los transcritos de ARN en una molécula de ADN. Sorprendentemente, tales experimentos revelaron que los ARNm de los adenovirus no hibridan con una sola región del ADN viral (Fig. 5.3). En su lugar, una sola molécula de ARNm hibrida con diversas regiones separadas del genoma viral. Por tanto, el ARNm del adenovirus no corresponde a un transcrito ininterrumpido de la hebra molde de ADN, sino que el ARNm se compone de bloques distintos de secuencias que proceden de diferentes partes del ADN viral. Se demostró que esto se debía al *splicing* o **empalme del ARN**, que se discutirá en detalle en el Capítulo 7.

Poco después del descubrimiento de los intrones en los adenovirus, se hicieron observaciones similares en genes clonados de células eucariotas. Por ejemplo, el análisis por microscopio electrónico de los híbridos de ARN-ADN y de las secuencias de nucleótidos siguientes de los ADN y ADNc clonados indicó que la región codificante del gen de la β-globina del ratón (que

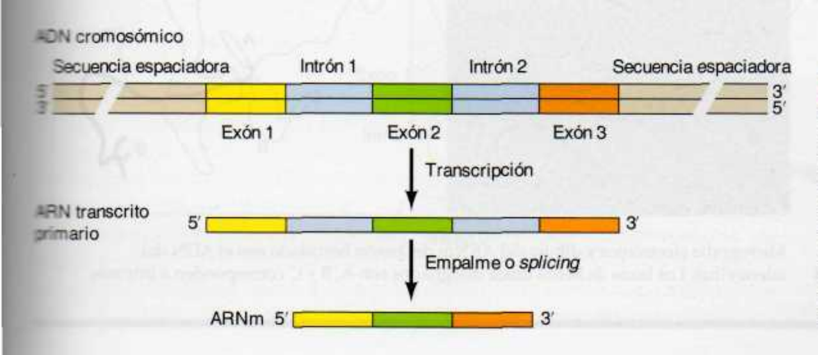


Figura 5.2 Estructura de los genes eucariotas. La mayoría de los genes eucariotas contienen segmentos de secuencias codificantes (exones) interrumpidas por secuencias no codificadoras (intrones). Los exones e intrones se transcriben para producir un ARN transcrito primario largo. Después los intrones se desprenden mediante *splicing* o empalme para formar el ARNm maduro.

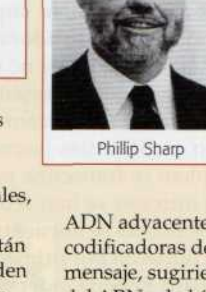


EXPERIMENTO CLAVE

Descubrimiento de los intrones

Splicing o empalme de segmentos en el extremo 5′ del ARNm tardío del adenovirus 2

Susan M. Berget, Claire Moore y Phillip A. Sharp
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts
Proceedings of the National Academy of Science USA, Volumen 74, 1997, págs. 3171-3175



Phillip Sharp



Richard Roberts

Contexto

Anterior a la clonación moleclar, se sabía poco sobre la sínteis del ARNm en las células eucariotas. Sin embargo, estaba claro que el proceso era mucho más complejo en eucariotas que en bacterias. La síntesis de ARNm de eucariotas parece necesitar no solo la transcripción, sino también reacciones de procesamiento que modifican la estructura de los transcritos primarios. Es más, los ARNm eucariotas parecían sintetizarse como transcritos primarios largos, localizados en el núcleo, que luego son escindidos para dar lugar a moléculas de ARNm mucho más cortas que se exportan al citoplasma.

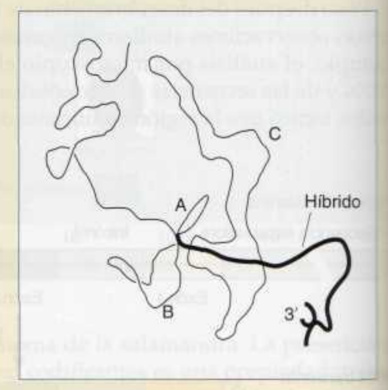
Estos pasos del procesamiento se asumieron como los responsables de la eliminación de las secuencias de los extremos 5′ y 3′ de los transcritos primarios. En este modelo los ARNm embebidos dentro de los transcritos primarios largos estarían codificados por secuencias de ADN no interrumpidas. Esta visión de los ARNm eucariotas cambió radicalmente cuando se descubrió el *splicing* o empalme, de forma independiente por Berget, Moore, y Sharp, y por Louise Chow, Richard Gelinas, Tom Broker y Richard Roberts. (Una organización increíble de secuencia en los extremos 5′ del ARN mensajero del adenovirus 2. *Cell* 12: 1-8, 1977.)

Experimentos

Ambos grupos de investigación que descubrieron el *splicing* o empalme utilizaron el adenovirus 2 para investigar la síntesis del ARNm en las células humanas. La mayor ventaja del virus es que proporciona un modelo que resulta mucho más simple que la célula huésped. El ADN viral se puede aislar directamente de las partículas virales, los ARNm codificadores de las estructuras de proteínas virales están presentes en tal cantidad que pueden ser purificados directamente de las células infectadas. Berget, Moore y Sharp centraron sus experimentos en un ARNm abundante que codifica un polipéptido viral estructural conocido como el hexón.

Para mapear el ARNm del hexón en el genoma viral, se hibridó ARNm puro con ADN de adenovirus, y las moléculas híbridas se examinaron por microscopia óptica. Como se esperaba, el «cuerpo» del ARNm del adenovirus que previamente se había mostrado que contenían el gen del hexón. Sorprendentemente, sin embargo, secuencias en el extremo 5′ del ARNm del hexón fallaron en la hibridación con las secuencias de ADN adyacentes a aquellas codificadoras del «cuerpo» del mensaje, sugiriendo que el extremo 5′ del ARNm había surgido de secuencias localizadas en alguna otra parte del genoma viral.
Esta posibilidad se probó mediante la hibridación del ARNm del hexón con un fragmento de restricción situado *upstream* del gen del hexón. Los híbridos ARNm-ADN formados en este experimento desplegaron una compleja estructura en forma de lazo (véase figura). El «cuerpo» del ARNm formó una larga región híbrida con las secuencias de ADN del hexón previamente identificadas.
Notablemente, el extremo 5′ del ARNm del hexón hibridó con tres regiones *upstream* cortas del ADN, que estaban separadas entre ellas y





Micrografía electrónica y dibujo del ARNm del hexón hibridado con el ADN del adenovirus. Los lazos de hebra única designados con A, B y C corresponden a intrones.

EXPERIMENTO CLAVE

del «cuerpo» del ARNm durante el procesamiento de un transcrito primario largo.

Impacto

El descubrimiento del *splicing* o empalme en el ARNm del adenovirus estuvo seguido por experimentos similares con ARNm celulares, demostrando que los genes eucariotas tenían una estructura no esperada. En lugar de ser continuas, sus secuencias codificantes estaban interrumpidas por intrones, que se eliminaban de los transcritos primarios mediante empalme. Ahora se sabe que los intrones representan la mayoría del ADN de los genomas eucariotas, y su papel en la evolución y en la regulación de la expresión génica continua formando parte de una de las áreas de investigación más activa. El descubrimiento del *splicing* o empalme también estimuló el interés por el mecanismo de esta reacción inesperada en el procesamiento del ARN. Como se discute en el Capítulo 7, estos estudios, no solo han arrojado luz sobre nuevos mecanismos de regulación génica; han revelado también nuevas actividades catalíticas del ARN y proporcionado evidencia crítica para sustentar la hipótesis de que la evolución más temprana estuvo basada en la autorreplicación de las moléculas de ARN. La inesperada estructura del ARNm de los adenovirus ha tenido por tanto un impacto esencial en diversas áreas de la biología celular y molecular.

codifica la subunidad β de la hemoglobina) está interrumpida por dos intrones que se retiran del ARNm mediante empalme o *splicing* (Fig. 5.4). La estructura intrón-exón de muchos genes eucariotas es complicada, siendo la cantidad de ADN en las secuencias de los intrones con frecuencia más grandes que la de los exones. Por ejemplo, un gen humano medio contiene aproximadamente 9 exones, interrumpidos por 8 intrones y distribuidos a lo largo de aproximadamente 30.000 pares de bases (30 **kilobases** o **kb**) de ADN genómico (Tabla 5.1). Los exones generalmente suman sólo unos 2,5 kb incluyendo las regiones de los extremos 5′y 3′ del ARNm que no se traducen

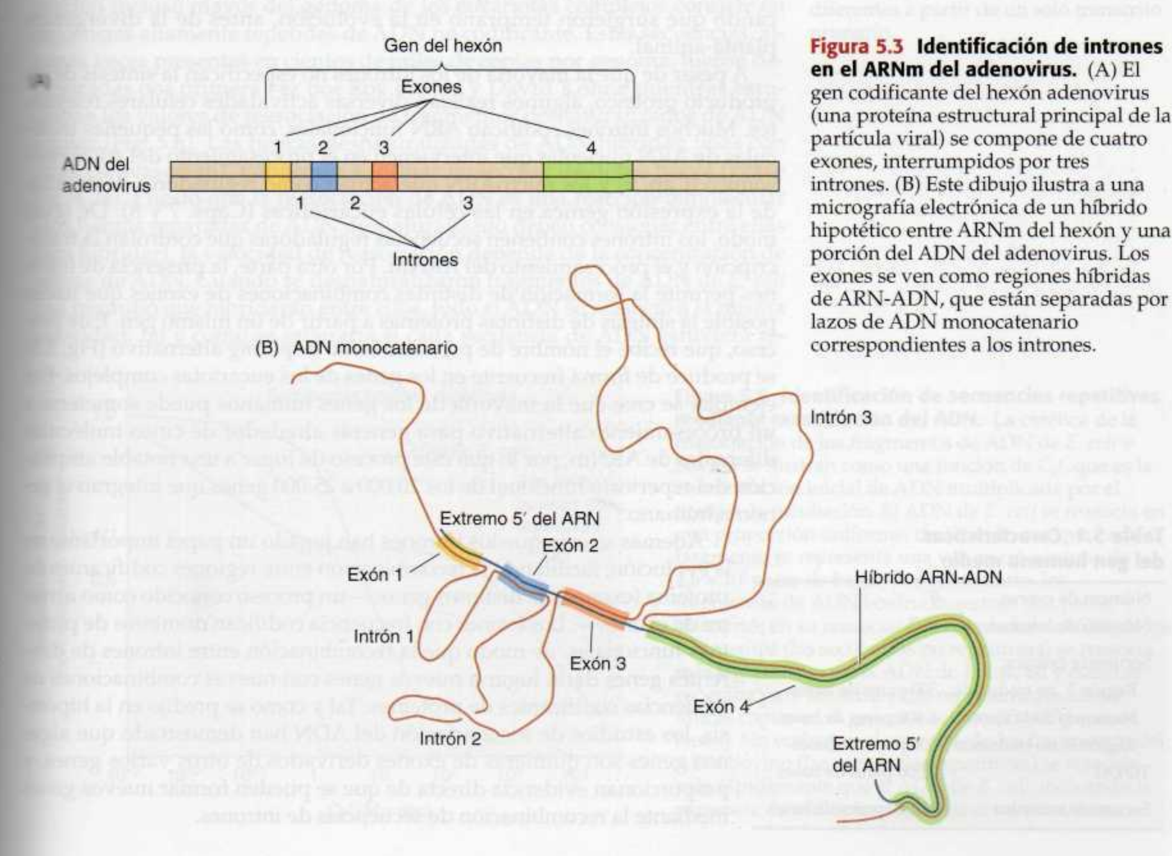


Figura 5.3 Identificación de intrones en el ARNm del adenovirus. (A) El gen codificante del hexón adenovirus (una proteína estructural principal de la partícula viral) se compone de cuatro exones, interrumpidos por tres intrones. (B) Este dibujo ilustra a una micrografía electrónica de un híbrido hipotético entre ARNm del hexón y una porción del ADN del adenovirus. Los exones se ven como regiones híbridas de ARN-ADN, que están separadas por lazos de ADN monocatenario correspondientes a los intrones.

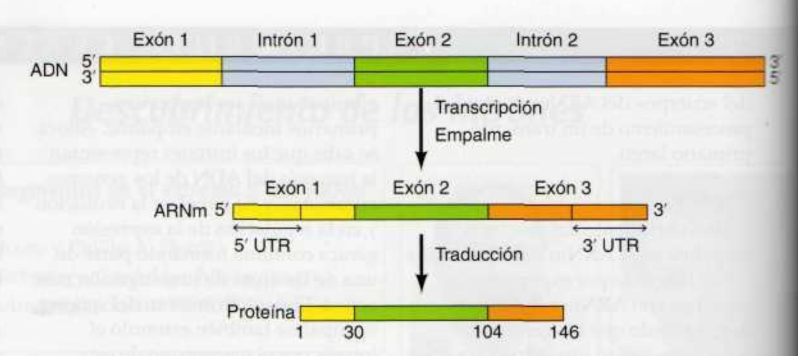


Figura 5.4 Gen de la β-globina en el ratón. Este gen contiene dos intrones, que dividen a la región codificadora en tres exones. El exón 1 codifica a los aminoácidos del 1 al 30, el exón 2 codifica aminoácidos del 31 al 104, y el exón 3 codifica a los aminácidos del 105 al 146. Los exones 1 y 3 también contienen regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5′ y 3′ del ARNm, respectivamente.

en proteínas (regiones 5′ y 3′ no traducidas o UTR: *untranslated regions*). Los intrones, por tanto, comprenden más del 90% del gen humano medio.

Los intrones están presentes en la mayoría de los genes de los eucariotas complejos, aunque no son universales. Casi todos los genes de las histonas, por ejemplo, carecen de intrones, por lo que claramente los intrones no son necesarios para la función del gen en las células eucariotas. Además, no se encuentran intrones en la mayoría de los genes de los eucariotas simples, como las levaduras. Por el contrario, los intrones están presentes en raros genes procariotas. La presencia o ausencia de intrones no es por tanto una distinción absoluta entre los genes procariotas y eucariotas, aunque los intrones prevalezcan en los eucariotas superiores (plantas y animales), donde representan una cantidad sustancial del ADN genómico total. Muchos intrones están conservados en genes tanto de plantas como de animales, indicando que surgieron temprano en la evolución, antes de la divergencia planta-animal.

A pesar de que la mayoría de los intrones no especifican la síntesis de un producto proteico, algunos realizan diversas actividades celulares relevantes. Muchos intrones codifican ARN funcionales, como las pequeñas moléculas de ARN nucleolar que intervienen en el procesamiento del ARN ribosómico (Cap. 9) y los microARN que actúan como reguladores destacados de la expresión génica en las células eucarióticas (Caps. 7 y 8). De igual modo, los intrones contienen secuencias reguladoras que controlan la transcripción y el procesamiento del ARNm. Por otra parte, la presencia de intrones permite la formación de distintas combinaciones de exones que hacen posible la síntesis de distintas proteínas a partir de un mismo gen. Este proceso, que recibe el nombre de procesamiento o *splicing* alternativo (Fig. 5.5) se produce de forma frecuente en los genes de los eucariotas complejos. Por ejemplo, se cree que la mayoría de los genes humanos puede someterse a un procesamiento alternativo para generar alrededor de cinco moléculas diferentes de ARNm, por lo que este proceso da lugar a una notable ampliación del repertorio funcional de los 20.000 a 25.000 genes que integran el genoma humano.

Tabla 5.1 Características del gen humano medio

Número de exones	9
Número de intrones	8
Secuencia exónica:	
Región 5′ no traducida	300 pares de bases
Secuencia codificante	1.400 pares de bases
Región 3′ no traducida	800 pares de bases
TOTAL	2.500 pares de bases
Secuencia intrónica	27.000 pares de bases

Además se cree que los intrones han jugado un papel importante en la evolución, facilitando la recombinación entre regiones codificantes de proteína (exones) de distintos genes —un proceso conocido como arrastre de exones—. Los exones con frecuencia codifican dominios de proteínas funcionales, de modo que la recombinación entre intrones de diferentes genes daría lugar a nuevos genes con nuevas combinaciones de secuencias codificantes de proteínas. Tal y como se predijo en la hipótesis, los estudios de secuenciación del ADN han demostrado que algunos genes son quimeras de exones derivados de otros varios genes, y proporcionan evidencia directa de que se pueden formar nuevos genes mediante la recombinación de secuencias de intrones.

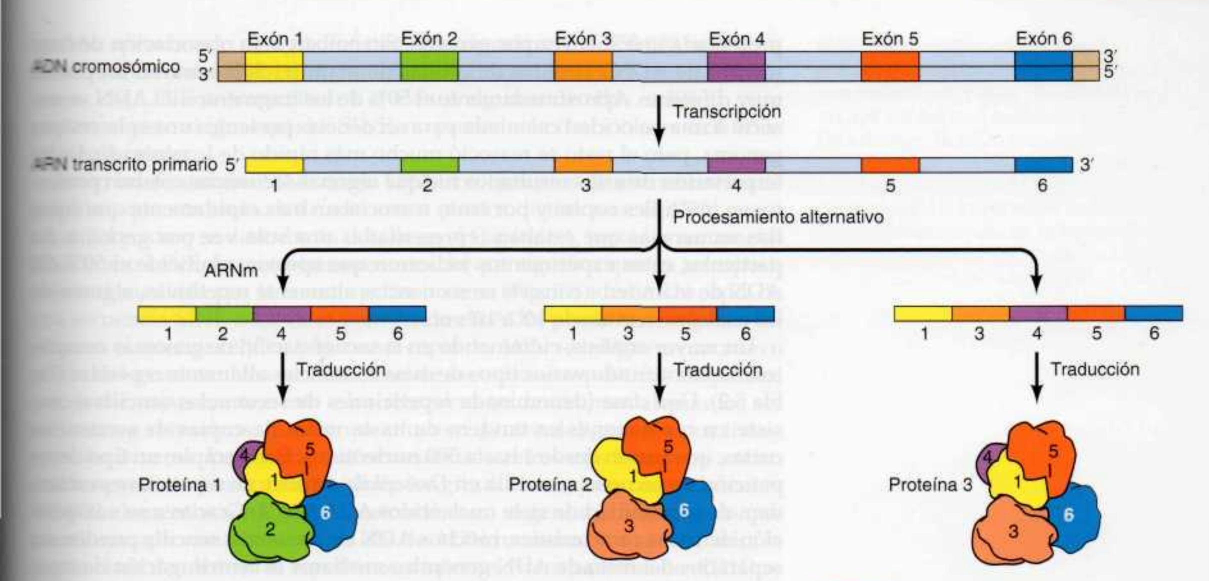


Figura 5.5 Procesamiento alternativo. El gen ilustrado contiene seis exones, separados por cinco intrones. El procesamiento alternativo permite que estos exones se unan en diferentes combinaciones, resultando en la formación de tres ARNm y proteínas diferentes a partir de un solo transcrito primario.

Secuencias de ADN repetitivas

Los intrones forman una contribución sustancial al gran tamaño de los genomas de eucariotas superiores. En humanos, por ejemplo, los intrones forman aproximadamente el 25% del ADN genómico total. Sin embargo, una porción incluso mayor del genoma de los eucariotas complejos consiste en secuencias altamente repetidas de ADN no codificante. Estas secuencias, algunas veces presentes en cientos de miles de copias por genoma, fueron demostradas por primera vez por Roy Britten y David Kohne mientras estudiaban los valores de reasociación de fragmentos desnaturalizados de ADN celular (Fig. 5.6). Las hebras desnaturalizadas de ADN hibridan unas con otras (se reasocian), volviendo a formar moléculas de doble hebra (véase Fig. 4.24). Puesto que la reasociación de ADN es una reacción bimolecular (dos hebras separadas de ADN desnaturalizado deben colisionar entre ellas para hibridar), la velocidad de reasociación depende de la concentración de hebras de ADN. Cuando se desnaturalizaron fragmentos de ADN de *E. coli* y se permitió que hibridaran entre ellos, todo el ADN se reasoció a la misma velocidad, tal y como se esperaría si cada secuencia de ADN estuviera re-

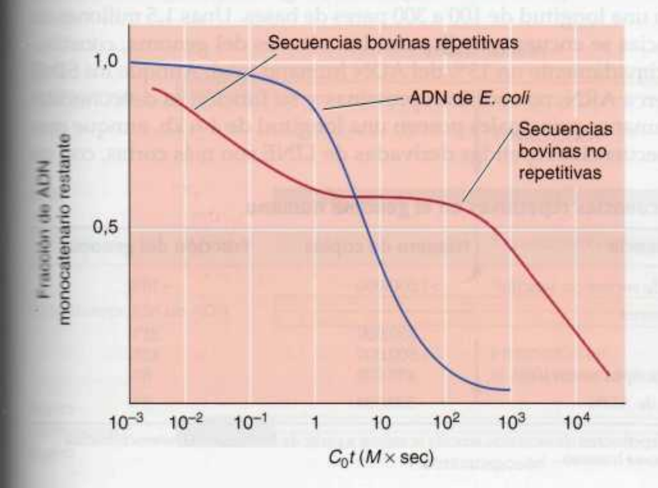


Figura 5.6 Identificación de secuencias repetitivas mediante reasociación del ADN. La cinética de la reasociación de los fragmentos de ADN de *E. coli* y bovino se ilustran como una función de C_0t, que es la concentración inicial de ADN multiplicada por el tiempo de incubación. El ADN de *E. coli* se reasocia en una proporción uniforme, de acuerdo con que cada fragmento se representa una vez en un genoma de $4{,}6 \times 10^6$ pares de bases. Por el contrario, los fragmentos de ADN bovino muestran dos pasos diferentes en su reasociación. Alrededor del 60% de los fragmentos (las secuencias no repetitivas) se reasocia más lentamente que el ADN de *E. coli*, tal y como se esperaba para las secuencias representadas como únicas copias en el genoma bovino (3×10^9 pares de bases). Sin embargo, el otro 40% de los fragmentos del ADN bovino (las secuencias repetitivas) se reasocia más rápidamente que el ADN de *E. coli*, indicando la presencia de múltiples copias de estas secuencias.

presentada una sola vez por genoma. Sin embargo, la reasociación de fragmentos de ADN extraídos de células de mamíferos mostraron un patrón muy diferente. Aproximadamente el 50% de los fragmentos de ADN se reasoció a una velocidad calculada para secuencias presentes una sola vez por genoma, pero el resto se reasoció mucho más rápido de lo esperado. La interpretación de estos resultados fue que algunas secuencias estaban presentes en múltiples copias y por tanto reasociaban más rápidamente que aquellas secuencias que estaban representadas una sola vez por genoma. En particular, estos experimentos indicaron que aproximadamente el 50% del ADN de mamíferos consiste en secuencias altamente repetitivas, algunas de las cuales se repiten de 10^5 a 10^6 veces.

Un mayor análisis, culminando en la secuenciación de genomas completos, ha identificado varios tipos de estas secuencias altamente repetidas (Tabla 5.2). Una clase (denominada **repeticiones de secuencias sencillas**) consiste en repeticiones en tandem de hasta miles de copias de secuencias cortas, que varían desde 1 hasta 500 nucleótidos. Por ejemplo, un tipo de repetición de secuencia sencilla en *Drosophila* consiste en repeticiones en tándem de una unidad de siete nucleótidos ACAAACT. Gracias a su composición de bases característica, muchos ADN de secuencia sencilla pueden ser separados del resto de ADN genómico mediante la centrifugación de equilibrio en gradientes de densidad de CsCl. La densidad del ADN está determinada por su composición de bases, donde las secuencias ricas en pares AT son menos densas que las secuencias ricas en pares GC. Así, un ADN de secuencia sencilla rico en AT bandea en un gradiente de CsCl a una densidad inferior que el resto del ADN genómico de *Drosophila* (Fig. 5.7). Ya que estas secuencias repetidas de ADN bandean como «satélites» separados de la banda principal de ADN, a menudo se denominan **ADN satélite**. Estas secuencias están repetidas millones de veces por genoma, constituyendo aproximadamente el 10% del ADN de la mayoría de los eucariotas superiores. Los ADN de secuencia sencilla no se transcriben y no proporcionan información genética funcional. Algunos, sin embargo, representan papeles importantes en la estructura cromosómica, como se estudia en la siguiente sección de este capítulo.

Otras secuencias repetitivas de ADN se encuentran dispersas a través del genoma en lugar de agrupadas en repeticiones en tándem. Estos elementos repetitivos dispersos son un contribuyente muy importante para el tamaño del genoma, constituyendo aproximadamente el 45% del ADN genómico humano. Las dos clases más predominantes de estas secuencias se denominan **SINE** (*short interspersed elements*) y **LINE** (*long interspersed elements*). Los SINE poseen una longitud de 100 a 300 pares de bases. Unas 1,5 millones de estas secuencias se encuentran dispersadas a través del genoma, constituyendo aproximadamente un 13% del ADN humano total. Aunque los SINE se transcriben a ARN, no codifican proteínas y su función es desconocida. Los LINE humanos principales poseen una longitud de 4-6 kb, aunque muchas de las secuencias repetidas derivadas de LINE son más cortas, con un

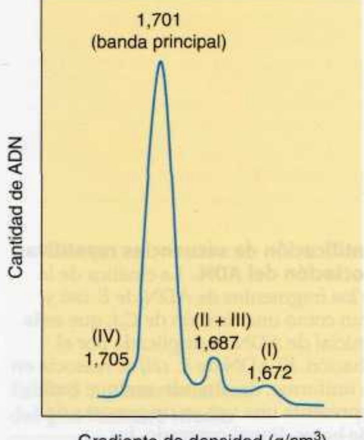


Figura 5.7 ADN satélite. La centrifugación de equilibrio del ADN de *Drosophila* en un gradiente de CsCl separa los ADN satélites (designados I-IV) con densidades en el gradiente (en g/cm³) de 1,672, 1,687, y 1,705 de la banda principal del ADN genómico (con una densidad en el gradiente de 1,701).

Tabla 5.2 Secuencias repetitivas en el genoma humano

Tipo de secuencia	Número de copias	Fracción del genoma
Repeticiones de secuencia sencilla[a]	>1.000.000	~10%
Retrotransposones		
LINE	850.000	21%
SINE	1.500.000	13%
Elementos de tipos retrovirus	450.000	8%
Transposones de ADN	300.000	3%

[a] El contenido de repeticiones de secuencia sencilla se estima a partir de la fracción de heterocromatina presente en el genoma humano.

tamaño aproximado de 1 kb. Existen aproximadamente 850.000 repeticiones de secuencias LINE en el genoma, constituyendo el 21% del ADN humano. Los LINE se transcriben y al menos algunos de ellos codifican para proteínas, pero al igual que los SINE, no poseen una función conocida en la fisiología celular.

Tanto las secuencias SINE como LINE son ejemplos de elementos transponibles, que son capaces de moverse a puntos distintos en el ADN genómico. Tal y como se describe en detalle en el Capítulo 6, tanto las secuencias SINE como LINE son **retrotransposones**, lo que significa que su transposición está mediada por la transcripción inversa (Fig. 5.8). Un ARN copia de una secuencia SINE o LINE es convertido en ADN por la transcriptasa inversa en el interior celular, y la nueva copia de ADN se integra en un nuevo punto del genoma. Una tercera clase de secuencias repetitivas dispersas, que se asemejan fuertemente a los retrovirus se denominan **elementos semejantes a retrovirus**, también se mueven dentro del genoma por transcripción inversa. Los elementos semejantes a retrovirus humanos varían desde aproximadamente 2-10 kb de longitud. Existen aproximadamente 450.000 *elementos semejantes a retrovirus en el genoma humano, lo que* constituye aproximadamente un 8% de ADN humano. Por el contrario, la cuarta clase de elementos repetitivos dispersos (**transposones de ADN**) se mueven por el genoma siendo copiados y reinsertados como secuencias de ADN, en lugar de moverse mediante transcripción inversa. En el genoma humano existen unas 300.000 copias de transposones de ADN, variando desde 80 a 3.000 pares de bases de longitud y constituyendo aproximadamente un 3% del ADN humano.

Así, prácticamente la mitad del genoma humano consiste en elementos repetitivos dispersos que se han replicado y movido a través del genoma a través de intermediarios de ARN o ADN. Merece la pena notar que la gran mayoría de estos elementos se transponen a través de intermediarios de ARN, de modo que la transcripción inversa ha sido responsable de la generación de más del 40% del genoma humano. Algunas de estas secuencias pueden ayudar en la regulación de la expresión génica, pero la mayoría de las secuencias repetitivas dispersas no parecen hacer una contribución útil a la célula. Por el contrario, parecen representar los «elementos de ADN egoístas» que han sido seleccionados por su propia capacidad de replicación dentro del genoma, en lugar de proporcionar una ventaja selectiva a su huésped. No obstante, los elementos transponibles han desempeñado un papel decisivo al estimular reordenamientos genéticos que han favorecido la diversidad genética.

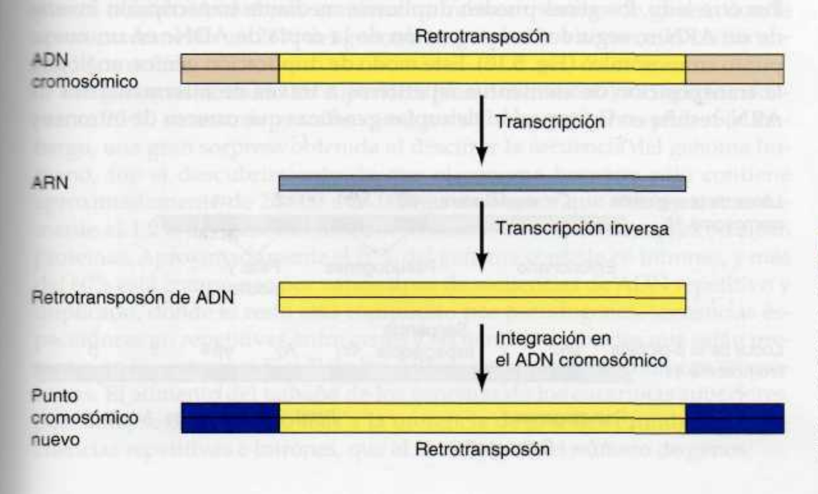


Figura 5.8 Movimiento de retrotransposones. Un retrotransposón presente en un punto del ADN cromosómico se transcribe en ARN, y a continuación es convertido de nuevo en ADN mediante transcripción inversa. El retrotransposón de ADN puede a continuación integrarse en un nuevo punto cromosómico.

Duplicación génica y pseudogenes

Otro de los factores que favorecen al gran tamaño de los genomas eucariotas es que algunos genes están presentes en múltiples copias, algunas de las cuales frecuentemente son afuncionales. En algunos casos, múltiples copias de genes son necesarias para producir ARN o proteínas requeridas en grandes cantidades, como los ARN ribosómicos o las histonas. En otros casos, miembros concretos de un grupo de genes relacionados (denominado una **familia génica**) pueden ser transcritos en diferentes tejidos o en diferentes etapas del desarrollo. Por ejemplo, las subunidades α y β de la hemoglobina se encuentran codificadas por familias de genes en el genoma humano, con diferentes miembros de esa familia expresados en el tejido embrionario, fetal y tejidos adultos (Fig. 5.9). Los miembros de muchas familias de genes (p. ej., los genes de la globina) se agrupan en una región del ADN; los miembros de otras familias están dispersos en cromosomas diferentes.

Las familias de genes se cree que han surgido de la duplicación de un gen ancestral original, divergiendo los diferentes miembros de una familia como consecuencia de mutaciones durante la evolución. Tal divergencia puede desembocar en la evolución de proteínas relacionadas capaces de funcionar en tejidos diferentes o en diferentes etapas del desarrollo. Por ejemplo, las globinas fetales presentan una mayor afinidad para el O_2 que las globinas adultas —una diferencia que permite al feto obtener O_2 de la circulación materna.

Como cabría esperar, sin embargo, no todas las mutaciones favorecen la función del gen. Algunas copias genéticas presentan mutaciones sustanciales que ocasionan la pérdida de la capacidad para producir un producto genético funcional. Por ejemplo, las familias de genes humanos de la α y β-globina contienen dos genes que han sido desactivados por mutaciones. Tales copias genéticas no funcionales (llamados **pseudogenes**) representan reliquias evolutivas que aumentan considerablemente el tamaño de los genomas eucariotas sin hacer ninguna contribución genética funcional. Estudios recientes han identificado más de 20.000 pseudogenes en el genoma humano. Puesto que se asume generalmente que se trata de una estimación a la baja, es probable que nuestro genoma contenga muchos más pseudogenes que genes funcionales.

Las duplicaciones génicas pueden surgir por dos mecanismos diferentes. La primera es la duplicación de un segmento de ADN, que puede resultar en la transferencia de un bloque de ADN a una nueva localización en el genoma. Se estima que dichas duplicaciones de segmentos de ADN de entre 1 kb y más de 50 kb, forman aproximadamente el 5% del genoma humano. Por otro lado, los genes pueden duplicarse mediante transcripción inversa de un ARNm, seguido de integración de la copia de ADNc en un nuevo punto cromosómico (Fig. 5.10). Este modo de duplicación génica, análogo a la transposición de elementos repetitivos a través de intermediarios de ARN, resulta en la formación de copias genéticas que carecen de intrones y

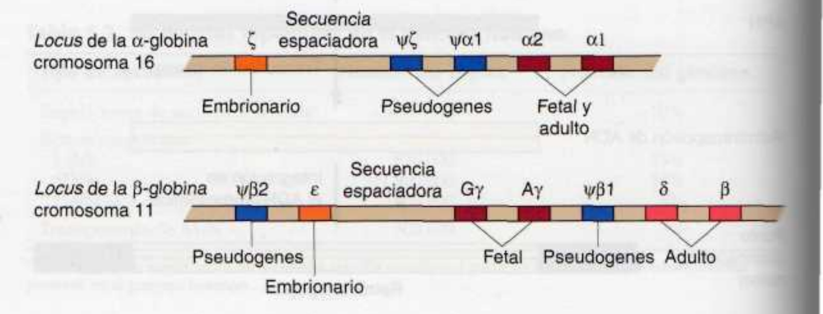


Figura 5.9 Familias del gen de la globina. Los miembros de las familias de los genes humanos de la α y β-globina se agrupan en los cromosomas 16 y 11, respectivamente. Cada familia contiene genes que se expresan específicamente en los tejidos embrionario, fetal y adulto, además de las copias de genes no funcionales (pseudogenes).

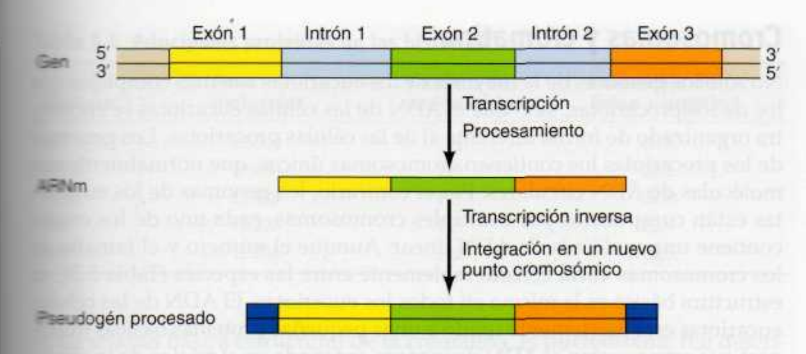


Figura 5.10 Formación de un pseudogén procesado. Un gen es transcrito y procesado para dar lugar a un ARNm del cual se han eliminado los intrones. El ARNm es copiado mediante transcripción inversa, dando lugar a una copia de ADNc que carece de intrones. La integración en el ADN cromosómico resulta en la formación de un pseudogén procesado.

que carecen también de las secuencias cromosómicas normales que dirigen la transcripción de un gen en ARNm. Como resultado, la duplicación de un gen por transcripción inversa generalmente da lugar a una copia génica inactiva denominada **pseudogén procesado**. Se estima que existen varios miles de pseudogenes procesados en el genoma humano.

Composición del genoma en los eucariotas superiores

Una vez vistos varios tipos de ADN no codificante que contribuyen a la complejidad genómica de los eucariotas superiores, es de interés revisar la composición de los genomas celulares. En los genomas bacterianos, la mayor parte del ADN codifica proteínas. Por ejemplo, el genoma de *E. coli* es aproximadamente de unas $4{,}6 \times 10^6$ pares de bases de longitud y contiene unos 4.000 genes, donde casi un 90% del ADN son secuencias codificantes para proteínas. El genoma de levaduras, que consiste en 12×10^6 pares de bases, posee un tamaño 2,5 veces el de *E. coli*, pero sigue siendo extremadamente compacto. Sólo el 4% de los genes de *Saccharomyces cerevisiae* contienen intrones, y normalmente éstos sólo poseen un pequeño intrón cerca del comienzo de la secuencia codificante. Aproximadamente un 70% del genoma de levaduras se emplea en secuencias codificantes de proteínas, especificando un total de aproximadamente 6.000 proteínas.

Los genomas animales relativamente sencillos de *C. elegans* y *Drosophila* son unas diez veces más grandes que el genoma de levaduras, pero contienen sólo dos o tres veces más genes. Por el contrario, estos genomas animales sencillos contienen más intrones y más secuencias repetitivas, de modo que las secuencias codificantes de proteínas corresponden sólo al 25% del genoma de *C. elegans* y un 13% del genoma de *Drosophila*. El genoma de la planta modelo *Arabidopsis* contiene un número similar de genes, donde aproximadamente un 26% del genoma corresponde a secuencias codificantes de proteínas.

Los genomas de animales superiores (como el humano) son aproximadamente 20-30 veces más grandes que los de *C. elegans* y *Drosophila*. Sin embargo, una gran sorpresa obtenida al descifrar la secuencia del genoma humano, fue el descubrimiento de que el genoma humano sólo contiene aproximadamente de 20.000 a 25.000 genes. Parece que sólo aproximadamente el 1,2% del genoma humano consiste en secuencias que codifican proteínas. Aproximadamente el 20% del genoma consiste en intrones, y más del 60% está compuesto por varios tipos de secuencias de ADN repetitivo y duplicado, donde el resto está compuesto por pseudogenes, secuencias espaciadoras no repetitivas entre genes y secuencias de exones que están presentes en los extremos 5′ y 3′ de los ARNm pero que no se traducen en proteínas. El aumento del tamaño de los genomas de los eucariotas superiores, por tanto, se debe mucho más a la presencia de grandes cantidades de secuencias repetitivas e intrones, que al incremento del número de genes.

Cromosomas y cromatina

No sólo los genomas de la mayoría de los eucariotas son más complejos que los de los procariotas, sino que el ADN de las células eucariotas se encuentra organizado de forma diferente al de las células procariotas. Los genomas de los procariotas los contienen cromosomas únicos, que normalmente son moléculas de ADN circulares. Por el contrario, los genomas de los eucariotas están compuestos por múltiples cromosomas, cada uno de los cuales contiene una molécula de ADN linear. Aunque el número y el tamaño de los cromosomas varía considerablemente entre las especies (Tabla 5.3), su estructura básica es la misma en todos los eucariotas. El ADN de las células eucariotas está fuertemente unido a unas pequeñas proteínas básicas (histonas) que empaquetan el ADN de manera ordenada en el núcleo de la célula. Esta característica resulta primordial, y se da en el ADN de la mayoría de los eucariotas. Por ejemplo, la longitud total extendida del ADN en una célula humana es de unos 2 m, pero este ADN debe caber en un núcleo con un diámetro de tan solo 5 µm a 10 µm.

Cromatina

Los complejos entre el ADN eucariótico y las proteínas forman la **cromatina**, que contiene alrededor del doble de proteína que de ADN. Las proteínas principales en la cromatina son las **histonas** —pequeñas proteínas que contienen una gran proporción de aminoácidos básicos (arginina y lisina) que facilitan la unión con la molécula de ADN cargada negativamente—. Existen cinco tipos importantes de histonas —llamadas H1, H2A, H2B, H3 y H4— que resultan muy similares entre las diferentes especies eucariotas (Tabla 5.4). Las histonas son tremendamente abundantes en las células eucariotas; su masa total resulta aproximadamente igual al ADN de la célula. Además, la cromatina contiene aproximadamente una masa igual de una variedad de proteínas cromosómicas diferentes a las histonas. Existen más de un millar de tipos diferentes de estas proteínas, que están implicadas múltiples actividades, incluyendo la replicación del ADN y la expresión génica.

5.1 Animación web

Cromatina y cromosomas

En una célula eucariota, el ADN está altamente enrollado en torno a las proteínas histonas (formando cromatina), y cuando una célula se prepara para la división, la cromatina se enrolla sobre sí misma múltiples veces para formar cromosomas compactos.

Tabla 5.3 Número de cromosomas en las células eucariotas

Organismo	Tamaño del genoma (Mb)[a]	Número[a] de cromosomas
Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)	12	16
Moho del lodo (*Dictyostelium*)	70	7
Arabidopsis thaliana	125	5
Maíz	5.000	10
Cebolla	15.000	8
Lirio	50.000	12
Nematodo (*Caenorhabditis elegans*)	97	6
Mosca de la fruta (*Drosophila*)	180	4
Sapo (*Xenopus laevis*)	3.000	18
Pez pulmón	50.000	17
Pollo	1.200	39
Ratón	3.000	20
Vaca	3.000	30
Perro	3.000	39
Humano	3.000	23

[a] Tanto el tamaño del genoma como el número de cromosomas son para células haploides.
Mb = millones de pares de bases.

Tabla 5.4 Principales proteínas de las histonas

Histona[a]	Peso molecular	Número de aminoácidos	Porcentaje de lisina + arginina
H1	22.500	244	30,8
H2A	13.960	129	20,2
H2B	13.774	125	22,4
H3	15.273	135	22,9
H4	11.236	102	24,5

La unidad básica estructural de la cromatina, el **nucleosoma**, fue descrito por Roger Kornberg en 1974 (Fig. 5.11). Kornberg propuso el modelo de nucleosoma de acuerdo con dos tipos de experimentos. Primero, la digestión parcial de la cromatina con la nucleasa micrococal (una enzima que degrada el ADN) produjo fragmentos de ADN con una longitud de 200 pares de bases. Por el contrario, una digestión similar de ADN desnudo (no asociado a proteínas) produjo una mancha continua de fragmentos de diferentes tamaños. Estos resultados sugirieron que la unión de las proteínas al ADN en la cromatina protege algunas regiones del ADN de la digestión por la nucleasa, de manera que la enzima puede atacar al ADN solamente en lugares separados por aproximadamente 200 pares de bases. De acuerdo con esta idea, la microscopia electrónica reveló que las fibras de cromatina tienen una apariencia de collar de cuentas, con las cuentas separadas a intervalos de unas 200 pares de bases. Por tanto, la digestión por la nucleasa y los estudios por microscopia electrónica sugirieron que la cromatina está compuesta por unidades que se repiten cada 200 pares de bases, que fueron llamadas nucleosomas.

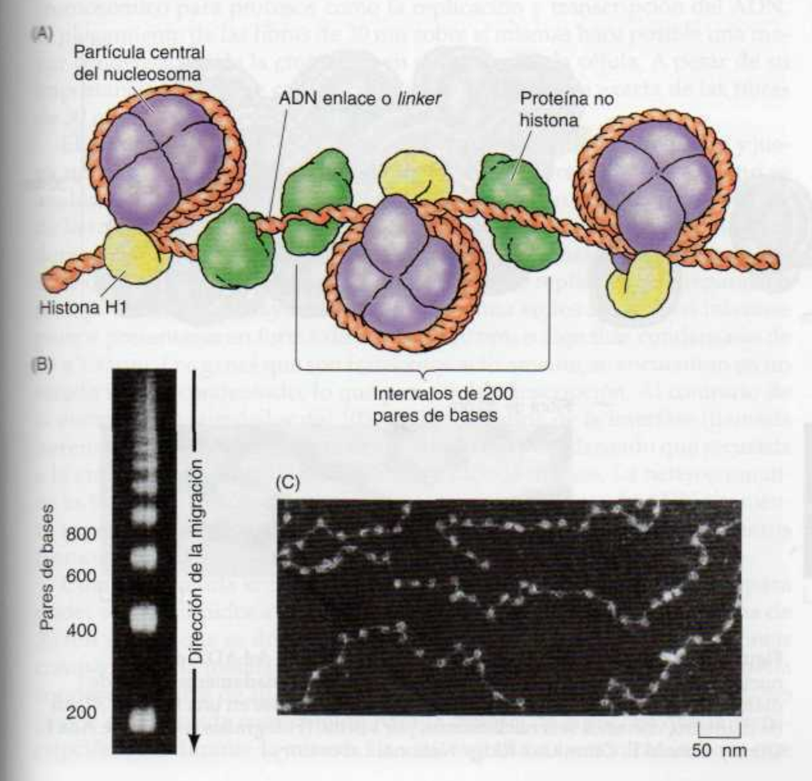
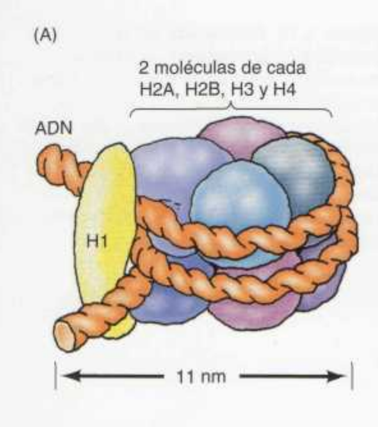


Figura 5.11 Organización de la cromatina en nucleosomas. (A) El ADN se envuelve alrededor de las histonas en las partículas centrales o core del nucleosoma y es sujetado por la histona H1. Las proteínas no histonas se unen al ADN de enlace o *linker* entre los nucleosomas y las partículas centrales. (B) Gel de electroforesis de fragmentos de ADN obtenidos de la digestión parcial de la cromatina con la nucleasa micrococal. El ADN de enlace entre las partículas centrales o *core* del nucleosoma es especialmente sensible, por lo que la digestión limitada de la cromatina produce fragmentos correspondientes a múltiplos de 200 pares de bases. (C) Una micrografía electrónica de una fibra de cromatina extendida, ilustrando su apariencia de collar de cuentas. (B, cortesía de Roger Kornberg, Stanford University; C; cortesía de Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)



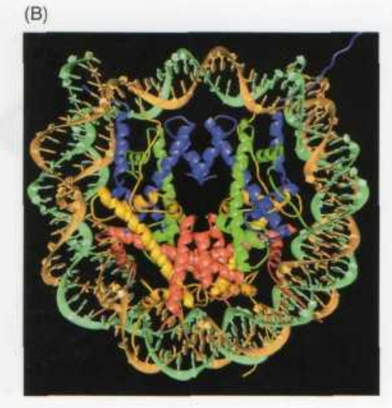


Figura 5.12 Estructura de un cromatosoma. (A) La partícula central o core del nucleosoma consta de 147 pares de bases de ADN envuelto 1,67 vueltas alrededor de un centro de histonas que consta de dos moléculas de cada H2A, H2B, H3 y H4. Un cromatosoma contiene dos vueltas completas de ADN (166 pares de bases) sujetas por una molécula de H1. (B) Modelo de una partícula central o core del nucleosoma. Las cadenas de ADN se muestran en marrón y en turquesa. Las histonas se muestran en azul (H3), verde (H4), amarillo (H2A) y rojo (H2B). (B, de K. Luger y cols., 1997. *Nature* 389: 251.)

Una digestión más extensa de la cromatina con la nucleasa microcócica producía partículas (llamadas **partículas centrales o cores del nucleosoma**) que correspondían a las cuentas visibles por microscopia electrónica. Un análisis detallado de estas partículas demostró que contienen 147 pares de bases de ADN enrolladas 1,67 veces alrededor del centro de histonas formado por dos moléculas de H2A, H2B, H3 y H4 (las histonas del centro) (Fig. 5.12). Una molécula de la quinta histona, H1, se encuentra unida al ADN cuando entra en una partícula central o core del nucleosoma. Esto forma una subunidad de cromatina llamada **cromatosoma**, que está compuesto por 166 pares de bases de ADN envuelto alrededor del centro de histonas y sujeto en su lugar por H1 (una histona de enlace).

El empaquetamiento del ADN con histonas produce una fibra de cromatina aproximadamente de 10 nm de diámetro y compuesta por cromatosomas separados por segmentos de enlace o *linker* de ADN de unos 50 pares de bases de longitud (Fig. 5.13). En el microscopio electrónico, esta fibra de 10 nm presenta la apariencia de collar de cuentas que sugiere el modelo del nucleosoma. Empaquetar el ADN en una fibra de cromatina de 10 nm reduce su longitud aproximadamente seis veces. La cromatina se puede condensar aún más enrollándola para formar fibras de 30 nm, resultando en una condensación total de unas 50 veces. Las interacciones entre las moléculas

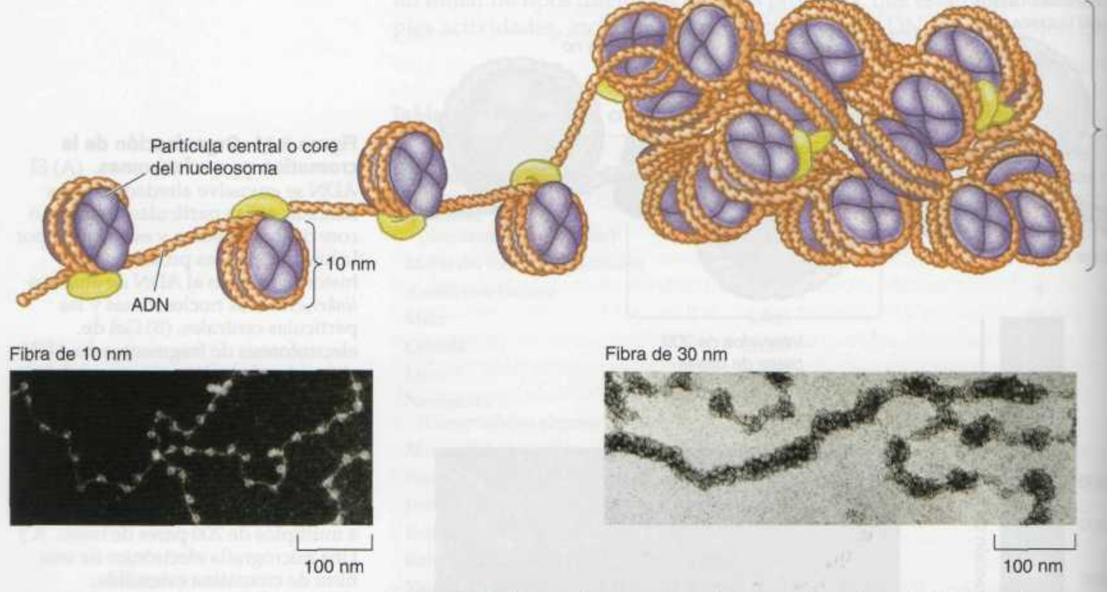


Figura 5.13 Fibras de cromatina. El empaquetamiento del ADN en los nucleosomas produce una fibra de cromatina de aproximadamente 10 nm de diámetro. La cromatina se condensa aún más enrollándose en una fibra de 30 nm de diámetro, con unos seis nucleosomas por vuelta. (Fotografías cortesía de Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)

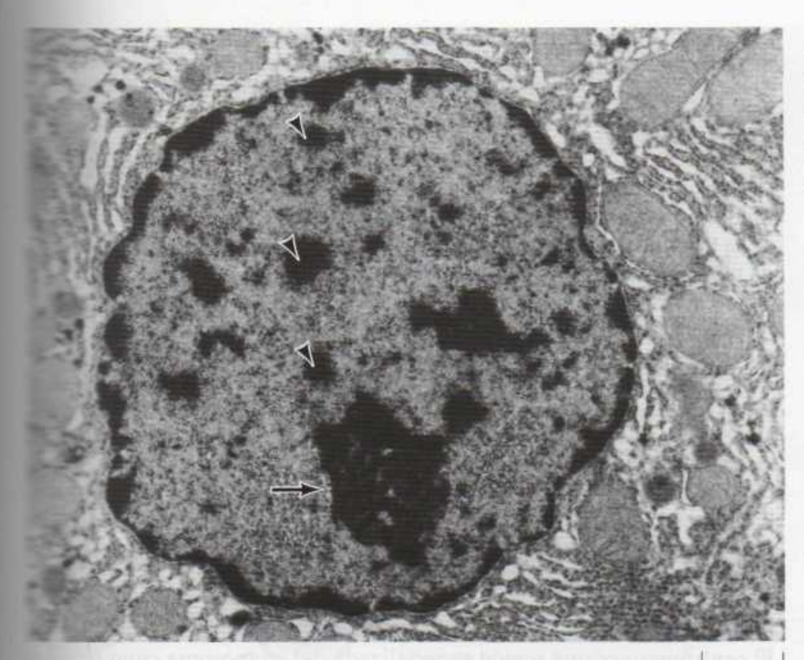


Figura 5.14 Cromatina en la interfase. Micrografía electrónica de un núcleo en interfase. La eucromatina se distribuye por el núcleo. La heterocromatina se indica con los triángulos y el nucléolo con una flecha. (Cortesía de Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)

de histona H1 parecen jugar un papel importante en esta fase de la condensación cromatínica, que es crítico para determinar la accesibilidad al ADN cromosómico para procesos como la replicación y transcripción del ADN. El plegamiento de las fibras de 30 nm sobre sí mismas hace posible una mayor condensación de la cromatina en el interior de la célula. A pesar de su importancia, aún no se conoce con detalle la estructura exacta de las fibras de 30 nm.

El grado de condensación cromatínica varía durante el ciclo celular y juega un papel importante en la regulación de la expresión génica, como se analizará en el Capítulo 7. En células en interfase (sin dividirse), la mayoría de la cromatina (llamada **eucromatina**) se encuentra relativamente sin condensar y distribuida por todo el núcleo (Fig. 5.14). Durante este período del ciclo celular, los genes se transcriben y el ADN se replica como preparación para la división. La mayoría de la eucromatina en los núcleos en interfase parece presentarse en forma de fibras de 30 nm, o algo más condensado de 60 a 130 nm. Los genes que son transcritos activamente, se encuentran en un estado menos condensado, lo que permite la transcripción. Al contrario de la eucromatina, alrededor del 10% de la cromatina de la interfase (llamada **heterocromatina**) se encuentra en un estado muy condensado que recuerda a la cromatina de las células que llevan a cabo la mitosis. La heterocromatina es transcripcionalmente inactiva y contiene secuencias de ADN altamente repetitivas, como aquellas presentes en los centrómeros y telómeros (como se describe en la siguiente sección).

Cuando la célula entra en mitosis, sus cromosomas se condensan para poder ser distribuidos a las células hijas. Los lazos de fibras de cromatina de 30 nm se cree que se doblan sobre sí mismos para formar los cromosomas compactos de la metafase de las células mitóticas, en las que el ADN se ha condensado cerca de 10.000 veces (Fig. 5.15). Esta cromatina condensada no puede ser utilizada como molde para la síntesis de ARN, así que la transcripción cesa durante la mitosis. Las micrografías electrónicas indican que



Figura 5.15 Condensación de la cromatina durante la mitosis. Micrografía electrónica de barrido de cromosomas de metafase. Añadido color artificial. (Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.)

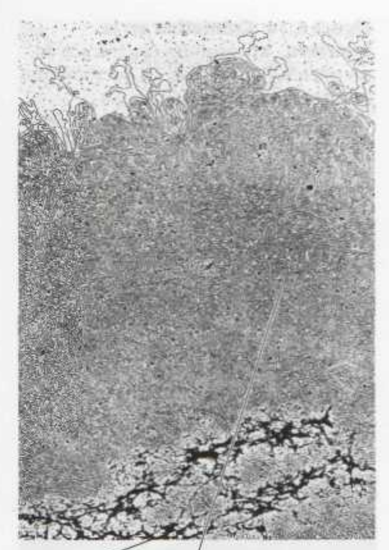


Figura 5.16 Estructura de los cromosomas de la metafase. Una micrografía electrónica de lazos de ADN unidos al andamio de proteína de los cromosomas en metafase que han sido liberados de las histonas. (De J. R. Paulson y U. K. Laemmli, 1977. *Cell* 12: 817.)

el ADN en los cromosomas de la metafase está organizado en grandes lazos unidos a un andamio o escalón de proteínas (Fig. 5.16), aunque todavía no se ha llegado a entender con detalle la estructura de la cromatina condensada ni el mecanismo de condensación de ésta.

Los cromosomas de la metafase se encuentran en un estado de concentración muy alto, tanto que su morfología puede ser estudiada a través del microscopio óptico (Fig. 5.17). Las diferentes técnicas de tinción proporcionan patrones característicos de bandas cromosómicas luminosas y oscuras, como resultado de la unión preferente de los tintes fluorescentes o de manchas a las secuencias de ADN ricas en AT en lugar de las secuencias ricas en GC. Estas son específicas para cada cromosoma y parecen representar diferentes regiones de los cromosomas. Los genes pueden ser localizados en bandas cromosómicas específicas mediante hibridación *in situ*, indicando que el empaquetamiento del ADN en los cromosomas de la metafase es un proceso con un riguroso orden y de carácter reproducible.

Centrómeros

El **centrómero** es una región especializada del cromosoma cuyo papel es asegurar la correcta distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas durante la mitosis (Fig. 5.18). El ADN celular se duplica durante la interfase, resultando la formación de dos copias de cada cromosoma antes de que comience la mitosis. Cuando la célula entra en mitosis, la condensación de la cromatina conduce a la formación de los cromosomas de la metafase que consisten en dos cromátidas hermanas idénticas. Estas cromátidas hermanas se mantienen unidas por el centrómero, el cual se considera como una región cromosómica compacta. Una vez iniciada la mitosis, los microtúbulos del huso mitótico se adhieren al centrómero, y las dos cromátidas hermanas se separan y se dirigen a los polos opuestos del huso. Al final de

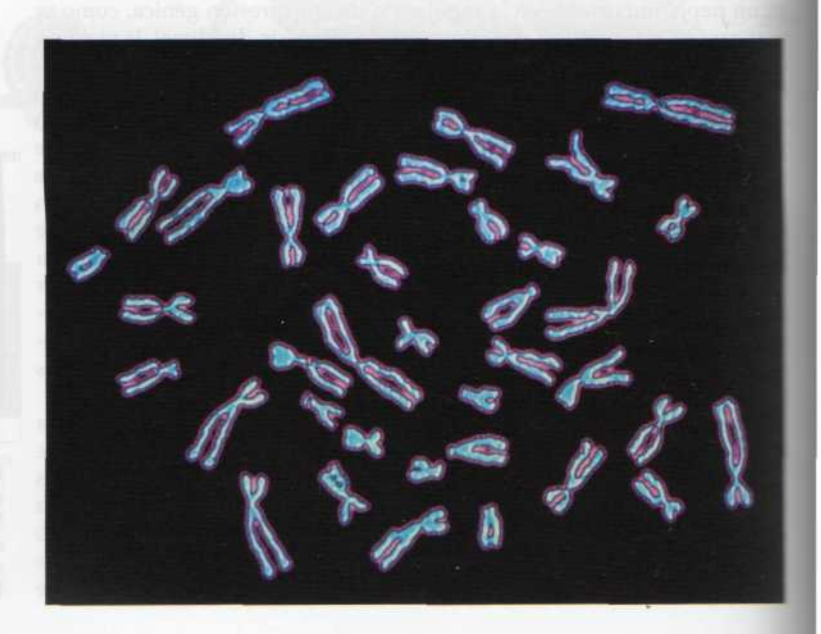


Figura 5.17 Cromosomas humanos en metafase. Una micrografía de cromosomas humanos extendidos a partir de una célula en metafase. (Leonard Lessin/Peter Arnold, Inc.)

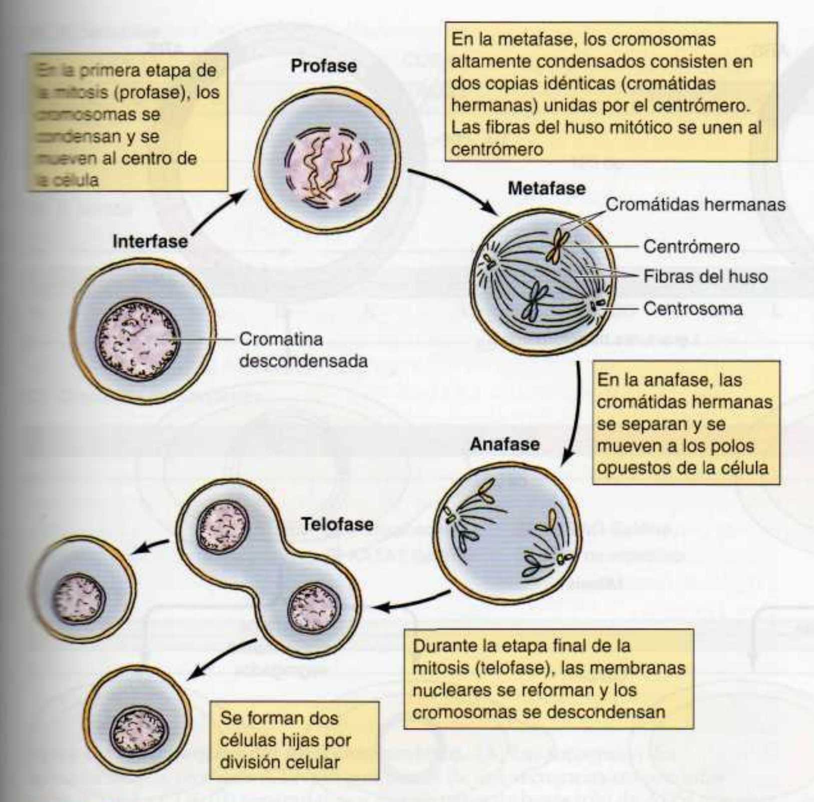


Figura 5.18 Cromosomas durante la mitosis. Puesto que el ADN se replica durante la interfase, la célula contiene dos copias duplicadas idénticas de cada cromosoma antes de entrar en mitosis.

la mitosis, las membranas nucleares se restablecen y los cromosomas se descondensan, resultando la formación de los núcleos de las células hermanas que contienen una copia de cada cromosoma parental.

Por tanto, los centrómeros actúan como sitios de asociación de las cromátidas hermanas y como sitios de unión para los microtúbulos del huso mitótico. Son secuencias específicas de ADN a las que se unen numerosas proteínas de unión asociadas a los centrómeros, formando una estructura llamada **cinetocoro** (Fig. 5.19). La unión de los microtúbulos a las proteínas del cinetocoro dirige la unión de los cromosomas al huso mitótico. Las proteínas asociadas al cinetocoro actúan como «motores moleculares» que conducen el movimiento de los cromosomas a lo largo de las fibras del huso, segregando los cromosomas a los núcleos de las células hijas.

Las mejores secuencias de ADN centroméricas han sido descritas en levaduras, donde su función puede probarse siguiendo la segregación de los plásmidos en mitosis (Fig. 5.20). Los plásmidos que contienen centrómeros

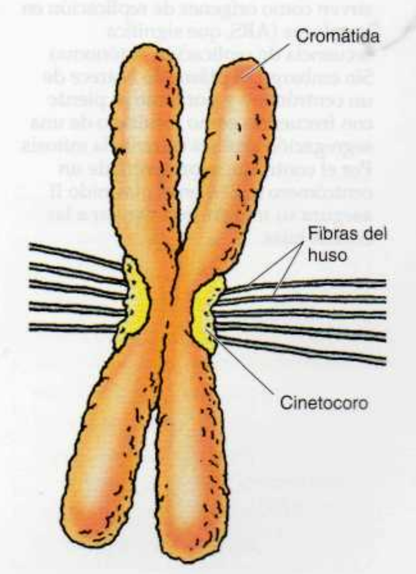


Figura 5.19 Centrómero en cromosomas de metafase. El centrómero es la región por donde las dos cromátidas hermanas siguen unidas en la metafase. Proteínas específicas se unen al ADN centromérico, formando el cinetocoro, que es el lugar de anclaje de las fibras del huso.

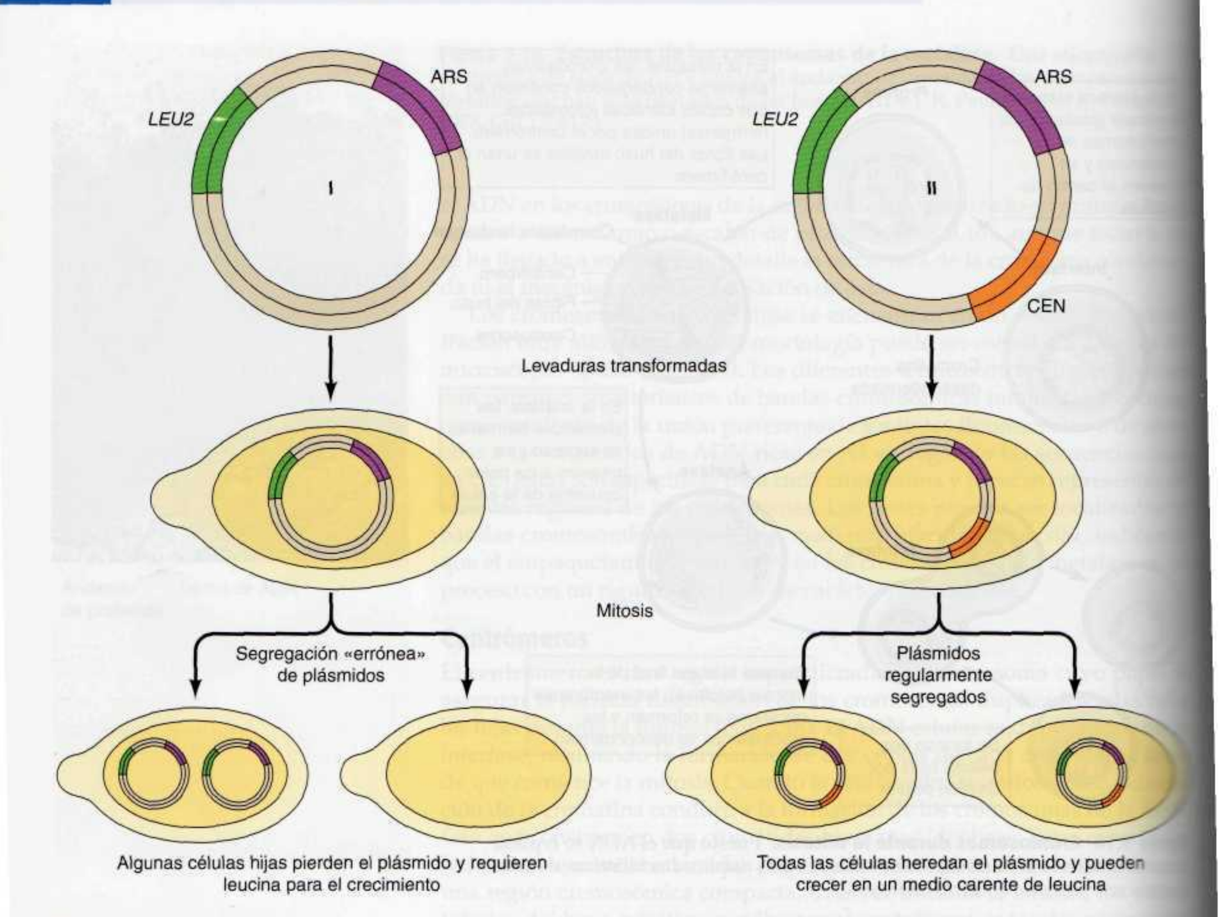


Figura 5.20 Ensayo de un centrómero en levaduras. Ambos plásmidos contienen un marcador (*LEU2*) y secuencias de ADN que sirven como orígenes de replicación en levaduras (ARS, que significa secuencia de replicación autónoma). Sin embargo, el plásmido I carece de un centrómero y por tanto se pierde con frecuencia como resultado de una segregación errónea durante la mitosis. Por el contrario, la presencia de un centrómero (CEN) en el plásmido II asegura su transmisión regular a las células hijas.

funcionales se segregan como los cromosomas y se distribuyen de igual forma a las células hijas una vez terminada la mitosis. En ausencia de un centrómero funcional, sin embargo, el plásmido no se segrega adecuadamente y muchas células hijas no heredan el ADN del plásmido. Los ensayos de este tipo han permitido determinar las secuencias necesarias para la función del centrómero. Este tipo de experimentos mostraron por primera vez que las secuencias de los centrómeros de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran aproximadamente en 125 pares de bases divididas en tres elementos de secuencia: dos secuencias cortas de 8 a 25 pares de bases separadas por 78-86 pares de bases de un ADN muy rico en A/T (Fig. 5.21A).

Las secuencias cortas de los centrómeros definidas en *S. cerevisiae*, no obstante, no parecen reflejar la situación en otros eucariotas, como la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Aunque *S. cerevisiae* y *S. pombe* son levaduras, parecen ser muy divergentes la una de la otra y muy diferentes en muchos aspectos de su biología celular. Estas dos especies de levaduras proporcionan modelos complementarios para el estudio de células eucariotas simples y de fácil estudio. Los centrómeros de *S. pombe* se extienden de 40 a 100 kb de ADN; son aproximadamente mil veces más largos que los de *S. cerevisiae*. Se componen de un centro de 4 a 7 kb de una sola copia de ADN flanqueada por secuencias repetitivas (Fig. 5.21B). Tanto el centro como las secuencias repetitivas flanqueantes son necesarios para el funcionamiento del centrómero, por lo que los centrómeros de *S. pombe* parecen ser considerablemente más complejos que los de *S. cerevisiae*.

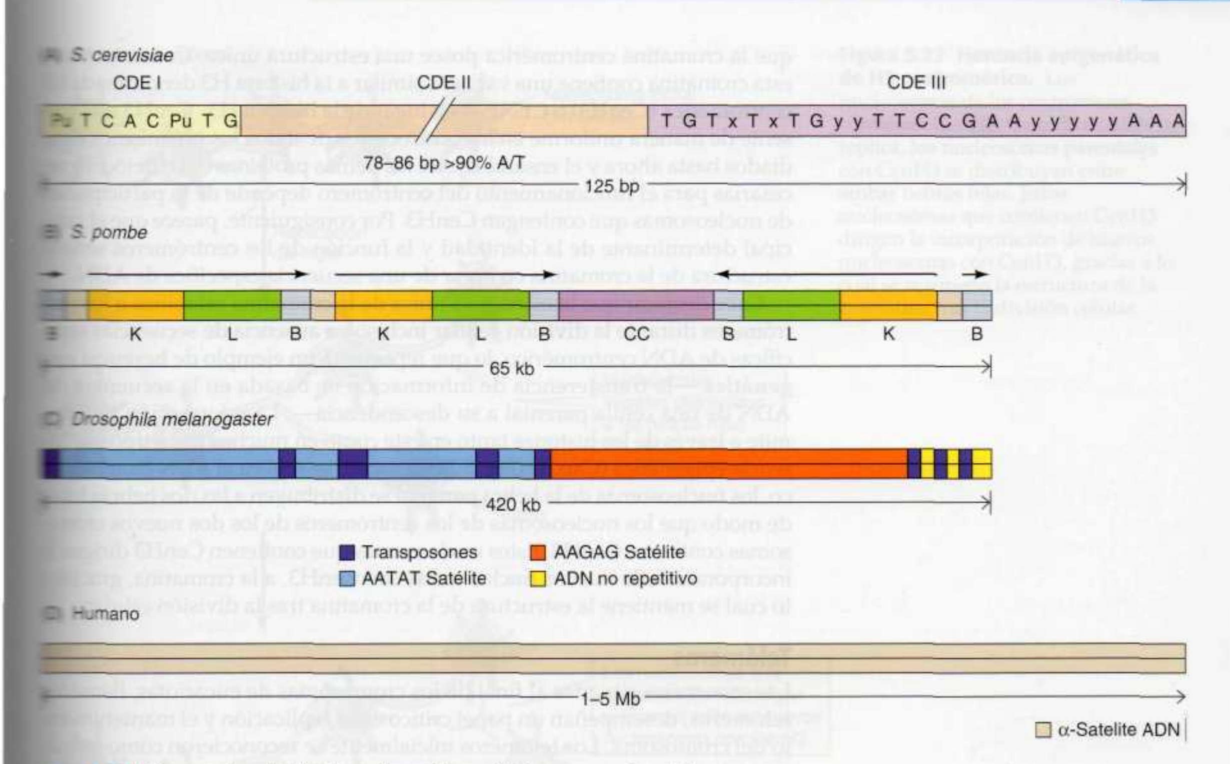


Figura 5.21 Secuencias del ADN centromérico. (A) Las secuencias del centrómero de *S. cerevisiae* (CEN) se componen de dos secuencias conservadas cortas (CDE I y CDE III) separadas por 78 a 86 pares de bases (pb) de ADN rico en A/T (CDE II). Las secuencias mostradas son secuencias consenso derivadas del análisis de las secuencias de los centrómeros de cromosomas individuales de levaduras. Pu = A o G; x = A o T; y = cualquier base. (B) Se ilustra la organización de las secuencias del centrómero del cromosoma II de *S. pombe*. El centrómero consiste en un grupo central (CC) de secuencia única de ADN, rodeado por repeticiones en tándem de tres elementos de secuencia repetitivos (B, K, y L). (C) El centrómero de *Drosophila* consiste en dos secuencias satélite, elementos transponibles y ADN no repetitivo que comprende varios cientos de kilobases (kb). (D) Centrómeros del ser humano formados por repeticiones tándem de ADN α-satélite rico en A/T de 171 pares de bases que comprende entre 1 y 5 millones de pares de bases (Mb).

Los estudios de un cromosoma de *Drosophila* han proporcionado la primera descripción de un centrómero en eucariotas superiores (Fig. 5.21C). El centrómero de *Drosophila* se extiende 420 kb, del cual la mayoría (más del 85%) consta de dos ADN satélites muy repetitivos con las secuencias AATAT y AAGAG. El resto del centrómero consta de elementos transponibles dispersos, que se encuentran también en otros sitios en el genoma de *Drosophila*, además de una región no repetitiva de ADN rica en A/T.

Los centrómeros de otras plantas y animales están caracterizados porque la heterocromatina contiene zonas extensas de secuencias altamente repetitivas. En *Arabidopsis*, los centrómeros consisten en 3 millones de pares de bases de un ADN satélite de 178 pares de bases rico en A/T, que es una secuencia de 171 pares de bases rica en A/T dispuesta en repeticiones en tándem que abarcan de 1-5 millones de pares de bases (Fig. 5.21D).

No se ha logrado identificar secuencias específicas de ADN vinculadas con la función centromérica en los eucariotas con excepción de *S. cerevisiae* a pesar de los esfuerzos realizados a este fin. Por otra parte, se ha demostrado

que la cromatina centromérica posee una estructura única. Concretamente, esta cromatina contiene una variante similar a la histona H3 denominada H3 centromérica **(CenH3)** o **CENP-A** en lugar de la histona H3. CenH3 está presente de manera uniforme en los centrómeros de todos los organismos estudiados hasta ahora y el ensamblaje de las demás proteínas del cinetócoro necesarias para el funcionamiento del centrómero depende de la participación de nucleosomas que contengan CenH3. Por consiguiente, parece que el principal determinante de la identidad y la función de los centrómeros sería la estructura de la cromatina en lugar de una secuencia específica de ADN.

Cabe destacar que la estructura única de la cromatina estabiliza a los centrómeros durante la división celular incluso en ausencia de secuencias específicas de ADN centromérico, lo que representa un ejemplo de **herencia epigenética** —la transferencia de información *no* basada en la secuencia de ADN de una célula parental a su descendencia—. La información se transmite a través de las histonas tanto en este como en muchos otros tipos de herencia epigenética (Cap. 7) (Fig. 5.22). Cuando se replica el ADN cromosómico, los nucleosomas de la hebra parental se distribuyen a las dos hebras hijas, de modo que los nucleosomas de los centrómeros de los dos nuevos cromosomas contienen CenH3. Estos nucleosomas que contienen CenH3 dirigen la incorporación de nuevos nucleosomas con CenH3 a la cromatina, gracias a lo cual se mantiene la estructura de la cromatina tras la división celular.

Telómeros

Las secuencias situadas al final de los cromosomas de eucariotas, llamadas **telómeros**, desempeñan un papel crítico en la replicación y el mantenimiento del cromosoma. Los telómeros inicialmente se reconocieron como estructuras distintas ya que los cromosomas rotos eran altamente inestables en las células eucariotas, implicando la necesidad de secuencias específicas en las terminaciones cromosómicas normales. Esto se demostró mediante experimentos en los que los telómeros del protozoo *Tetrahymena* fueron añadidos a los extremos de moléculas lineales de ADN plasmídico de levaduras. La suma de estas secuencias de ADN telomérico permitió a estos plásmidos replicarse como cromosomas lineales igual que las moléculas en las levaduras, demostrando directamente que los telómeros son necesarios para la replicación de las moléculas lineales de ADN.

Las secuencias de ADN de los telómeros de los eucariotas son similares, presentando repeticiones de una secuencia simple de ADN que contiene grupos de residuos de G en una hebra (Tabla 5.5). Por ejemplo, la secuencia de las repeticiones de los telómeros en humanos y en otros mamíferos es TTAGGG y la repetición telomérica en *Tetrahymena* es TTGGGG. Estas secuencias se repiten cientos o miles de veces, y terminan con una prolongación en el extremo 3′ de una sola hebra de ADN. Las secuencias repetidas del ADN telomérico de algunos organismos (incluyendo el ser humano) forman bucles al final de los cromosomas y se une a un complejo proteico que protege a los extremos del cromosoma frente a su degradación (Fig. 5.23).

Los telómeros desempeñan un papel importante en la replicación de los extremos de las moléculas de ADN linear (véase Cap. 6). La ADN polimerasa es capaz de extender una cadena de ADN en crecimiento pero no puede iniciar la síntesis de una nueva cadena al final de una molécula linear de ADN. Como consecuencia, las terminaciones de los cromosomas lineales no pueden ser replicadas por la ADN polimerasa en condiciones normales. Este problema se ha resuelto por la evolución de una enzima especial, la **telomerasa**, que emplea actividad transcriptasa inversa para replicar las secuencias de ADN telomérico. El mantenimiento de los telómeros parece ser un factor importante a la hora de determinar las expectativas de vida y la capacidad reproductiva de las células, por lo que los estudios de los telóme-

Tabla 5.5 ADN teloméricos

Organismo	Secuencia telomérica repetida
Levaduras	
Saccharomyces cerevisiae	$TG_{1\text{-}3}$
Schizosaccharomyces pombe	$TTACG_{2\text{-}5}$
Protozoo	
Tetrahymena	TTGGGG
Dictyostelium	$AG_{1\text{-}8}$
Planta	
Arabidopsis	TTTAGGG
Mamífero	
Humano	TTAGGG

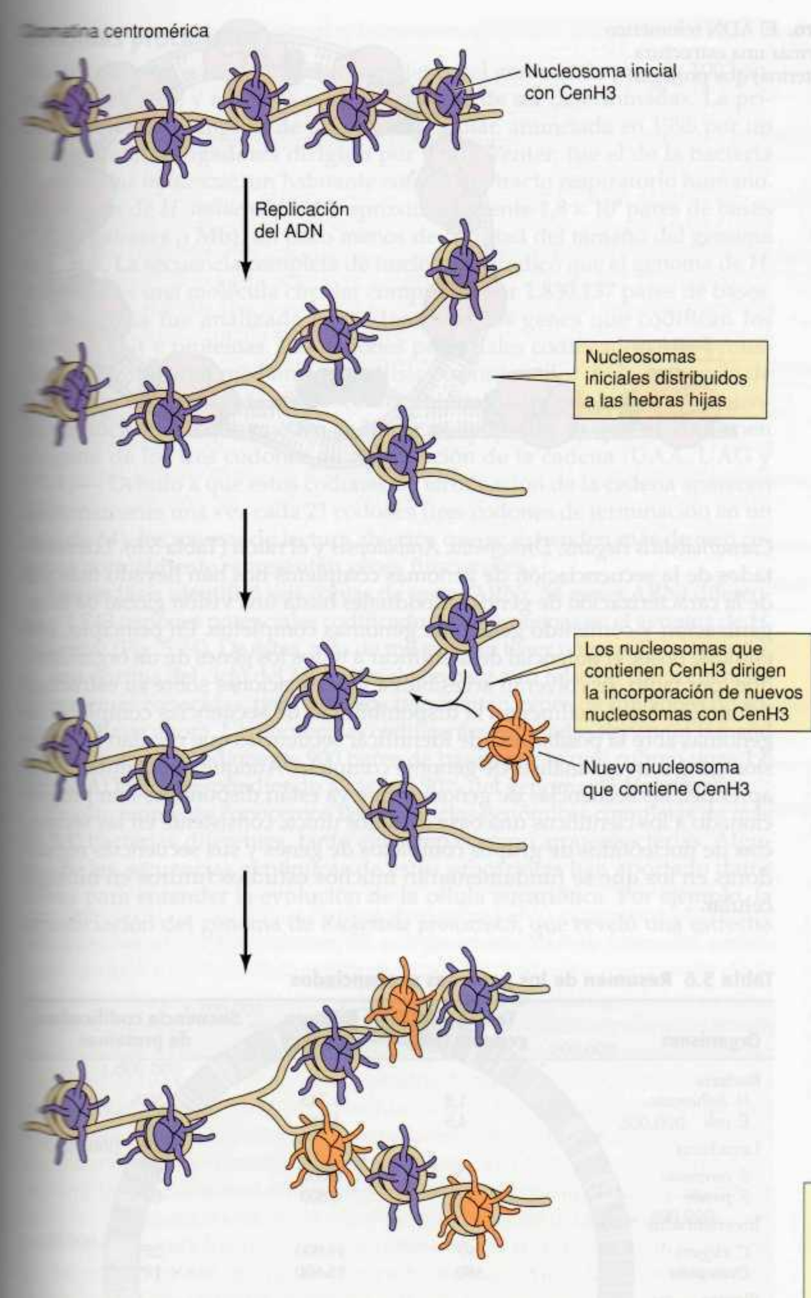


Figura 5.22 Herencia epigenética de H3 centromérica. Los nucleosomas de los centrómeros contienen CenH3. Cuando el ADN se replica, los nucleosomas parentales con CenH3 se distribuyen entre ambas hebras hijas. Estos nucleosomas que contienen CenH3 dirigen la incorporación de nuevos nucleosomas con CenH3, gracias a lo cual se mantiene la estructura de la cromatina tras la división celular.

...os y de la telomerasa son prometedores al respecto de nuevos datos sobre ...uestiones como la edad y el cáncer.

Secuencias de los genomas completos

Algunos de los esfuerzos más excitantes en la biología molecular son los dirigidos actualmente hacia la obtención y análisis de las secuencias completas de nucleótidos del genoma humano y de los genomas de diversos modelos de organismos, incluyendo a *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*,

■ **Las células cancerosas tienen niveles elevados de telomerasa, lo que les permite mantener los extremos de sus cromosomas a través de un número indefinido de divisiones. Puesto que las células somáticas normales carecen de actividad telomerasa y no se dividen indefinidamente, los principios activos que inhiben la telomerasa se están desarrollando como agentes anti-cáncer.**

Figura 5.23 Estructura de un telómero. El ADN telomérico forma un bucle sobre sí mismo para formar una estructura circular con un complejo proteico (shelterina) que protegen los extremos de los cromosomas.

Caenorhabditis elegans, *Drosophila*, *Arabidopsis* y el ratón (Tabla 5.6). Los resultados de la secuenciación de genomas completos nos han llevado más allá de la caracterización de genes individuales hasta una visión global de la organización y contenido génico de genomas completos. En principio, este enfoque posee el potencial de identificar a todos los genes de un organismo, que, por tanto, se volverán accesibles a investigaciones sobre su estructura y función. Adicionalmente, la disponibilidad de secuencias completas de genomas abre la posibilidad de identificar secuencias que regulan la expresión génica en un análisis de genoma completo. Aunque queda mucho por aprender, las secuencias de genomas que ya están disponibles han proporcionado a los científicos una base de datos única, consistente en las secuencias de nucleótidos de grupos completos de genes y sus secuencias reguladoras en los que se fundamentarán muchos estudios futuros en biología celular.

Tabla 5.6 Resumen de los genomas secuenciados

Organismo	Tamaño del genoma (Mb)[a]	Número de genes	Secuencia codificadora de proteínas
Bacteria			
H. influenzae	1,8	1.743	89%
E. coli	4,6	4.288	88%
Levaduras			
S. cerevisiae	12	6.000	70%
S. pombe	12	4.800	60%
Invertebrados			
C. elegans	97	19.000	25%
Drosophila	180	13.600	13%
Plantas			
Arabidopsis thaliana	125	26.000	25%
Arroz	390	37.000	12%
Peces			
Pez globo	370	20.000–23.000	10%
Aves			
Pollo	1.000	20.000–23.000	3%
Mamíferos			
Humano	3.200	20.000–25.000	1,2%

[a] Mb = millones de pares de base.

Genomas procariotas

Ahora conocemos las secuencias completas del genoma de más de 100 bacterias diferentes, y aún más están en proceso de ser determinadas. La primera secuencia completa de un genoma celular, anunciada en 1995 por un equipo de investigadores dirigido por Craig Venter, fue el de la bacteria *Haemophilus influenzae*, un habitante común del tracto respiratorio humano. El genoma de *H. influenzae* tiene aproximadamente $1,8 \times 10^6$ pares de bases (1,8 **megabases** o **Mb**), un poco menos de la mitad del tamaño del genoma de *E. coli*. La secuencia completa de nucleótidos indicó que el genoma de *H. influenzae* es una molécula circular compuesta por 1.830.137 pares de bases. La secuencia fue analizada para identificar los genes que codifican los ARNr, ARNt y proteínas. Las regiones potenciales codificadoras de proteínas se identificaron mediante el análisis por ordenador de la secuencia de ADN para detectar las **fases de lectura abiertas** —tramos largos de secuencia de nucleótidos que pueden codificar polipéptidos ya que no contienen ninguno de los tres codones de terminación de la cadena (UAA, UAG y UGA)—. Debido a que estos codones de terminación de la cadena aparecen aleatoriamente una vez cada 21 codones (tres codones de terminación en un total de 64), los marcos de lectura abiertos que se extienden más de cien codones normalmente representan genes funcionales.

Este análisis identificó seis copias de genes ARNr, 54 genes ARNt diferentes y 1.743 regiones potenciales codificadoras de proteínas en el genoma de *H. influenzae* (Fig. 5.24). De éstas, más de mil pueden tener un papel biológico (p. ej., una enzima del ciclo del ácido cítrico) en base a su relación con secuencias de proteínas conocidas, pero los otros representan genes de funciones no conocidas hasta ahora. Las secuencias codificantes esperadas tienen un tamaño medio de aproximadamente 900 pares de bases, por lo que cubren unas 1,6 Mb de ADN, correspondiendo a casi un 90% del genoma de *H. influenzae*.

En este momento conocemos las secuencias genómicas completas de más de 500 bacterias diferentes, tanto eubacterias como arqueobacterias. Algunas de las secuencias genómicas de estos procariotas han aportado datos claves para entender la evolución de la célula eucariótica. Por ejemplo, la secuenciación del genoma de *Rickettsia prowazekii*, que reveló una estrecha

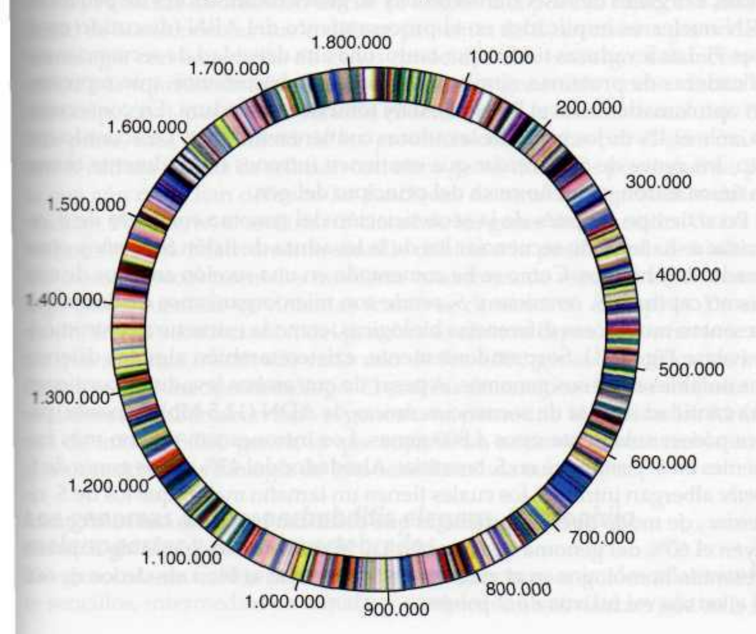


Figura 5.24 Genoma de *Haemophilus influenzae*. Las regiones codificadoras de proteínas predecibles se designan con las barras de colores. Los números indican pares de bases de ADN. (De R. D. Fleischmann y cols., 1995. *Science* 269: 496.)

relación filogenética con los genomas de las mictocondrias actuales, supuso un firme respaldo al origen endosimbiótico de la mitocondria (véase Cap. 1). De igual modo, las secuencias arqueobacterianas indicaron que los genes eucarióticos que codifican proteínas implicadas en la replicación, transcripción y traducción del ADN provenían de las arqueobacterias en lugar de las eubacterias (véase Fig. 1.7)

Aunque la relativa simplicidad y facilidad de la genética de *E. coli* lo ha convertido en un organismo favorable para la biología molecular, el genoma de 4,6 Mb de *E. coli* no se completó hasta 1997. El análisis de la secuencia de *E. coli* revela un total de 4.288 genes, con un 88% del genoma representado por secuencias codificadoras de proteínas. De los 4.288 descubiertos mediante secuenciación, 1.835 habían sido identificados con anterioridad y las funciones de 821 pudieron ser deducidas por comparaciones con las secuencias de genes ya descritos en otros organismos. Sin embargo, no se han logrado determinar las funciones de más de una tercera parte de los genes de *E. coli.* Estos genes siguen estudiándose en la actualidad, lo que pone de manifiesto la gran cantidad de datos sobre la biología de las células procarióticas que continúan sin conocerse incluso en el caso de un microorganismo tan estudiado como *E. coli.*

Genoma de levaduras

Como ya dijimos anteriormente, el genoma eucariota más sencillo ($1,2 \times 10^7$ pares de bases de ADN) se encuentra en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Además, las levaduras crecen rápido y son objeto de manipulaciones genéticas simples. Por tanto, las levaduras son un modelo de célula eucariota que puede ser estudiada con mayor facilidad que las células de los mamíferos u otros eucariotas superiores. Como consecuencia, la secuenciación completa de un cromosoma de levadura en 1992 (Fig. 5.25), seguida de la determinación de la secuencia completa del genoma en 1996, representaron los pasos más importantes en el entendimiento de la biología molecular de las células eucariotas.

El genoma de *S. cerevisiae* contiene unos 6.000 genes, incluyendo 5.885 supuestas secuencias codificadoras de proteínas, 140 genes de ARN ribosómicos, 275 genes de ARN transferente y 40 genes codificadores de pequeños ARN nucleares implicados en el procesamiento del ARN (discutido en el Cap. 7). Las levaduras tienen, por tanto, una alta densidad de secuencias codificadoras de proteínas, similar a los genomas bacterianos, que representan aproximadamente el 70% del ADN total de la levadura. En consecuencia, sólo el 4% de los genes de levaduras contienen intrones. De acuerdo con esto, los genes de *S. cerevisiae* que contienen intrones normalmente tienen un único intrón pequeño cerca del principio del gen.

Poco tiempo después de la secuenciación del genoma completo de *S. cerevisiae* se ha logrado secuenciar los de la levadura de fisión *S. pombe* y otras levaduras y hongos. Como se ha comentado en una sección anterior de este mismo capítulo, *S. cerevisiae* y *S. pombe* son microorganismos distintos que presentan numerosas diferencias biológicas, como la estructura centromérica (véase Fig. 5.21). Sorprendentemente, existen también algunas diferencias notables entre sus genomas. A pesar de que ambas levaduras contienen una cantidad similar de secuencias únicas de ADN (12,5 Mb), *S. pombe* parece poseer solamente unos 4.800 genes. Los intrones son mucho más frecuentes en *S. pombe* que en *S. cerevisiae*. Alrededor del 43% de los genes de *S. pombe* albergan intrones, los cuales tienen un tamaño mayor que los de *S. cerevisiae* , de modo que las secuencias que codifican proteínas tan solo constituyen el 60% del genoma de *S. pombe*. La mayoría de los genes de *S. pombe* presentan homólogos en el genoma de *S. cerevisiae*, si bien alrededor de 600 de ellos son exclusivos de *S. pombe*.

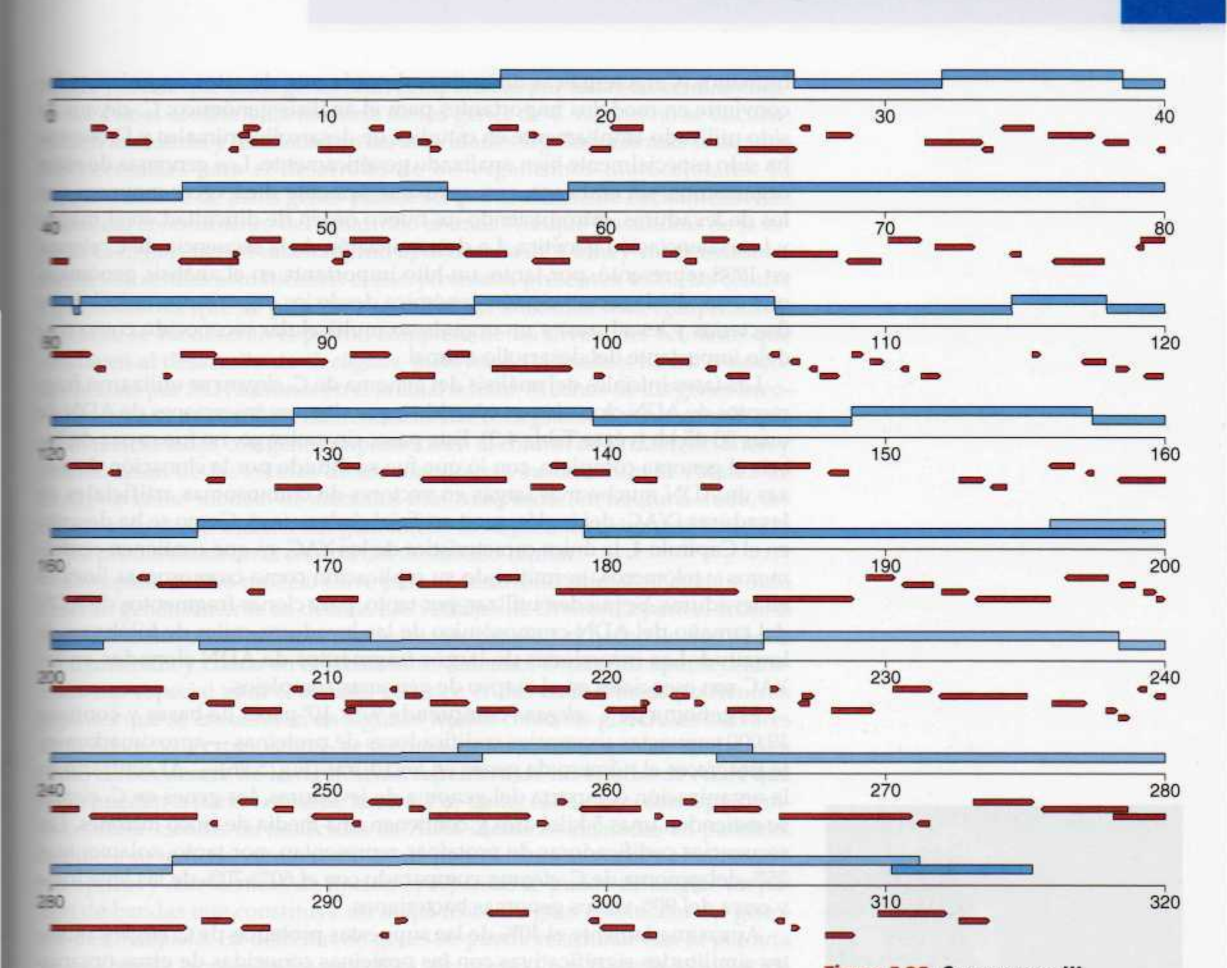


Figura 5.25 Cromosoma III de levaduras. Las barras superiores azules designan los clones utilizados para la secuenciación del ADN. Los marcos abiertos de lectura o fases de lectura abiertas se indican con flechas. (De S. G. Oliver y cols., 1992. *Nature* 357: 38.)

En el análisis informático inicial se asignó una posible función a casi la mitad de las secuencias que codifican proteínas de *S. cerevisiae* a partir de la homología con secuencias de genes conocidos. Sin embargo, solamente se conocía la función de estos genes en términos generales (como «factor de transcripción»), pero no su función concreta en el entorno intracelular. Por otra parte, más de la mitad de las proteínas codificadas por el genoma de esta levadura carecía de relación con otros genes descritos previamente, por lo que aún no se han definido las funciones de otras 3.000 proteínas desconocidas. Por suerte, el análisis funcional de los genes desconocidos de las levaduras resulta relativamente sencillo debido a la posibilidad de inactivar *loci* cromosómicos normales mediante reacciones de recombinación homóloga con secuencias ya clonadas (como se comenta en el Cap. 4). De este modo, tras la secuenciación del genoma se crearon cepas de *S. cerevisiae* en las que se había inactivado cada uno de los 6.000 genes identificados mediante recombinación homóloga. El análisis sistemático de este conjunto de mutantes que abarcaban todo el genoma ha permitido identificar las funciones de más de 5.000 genes, lo que supone un adelanto considerable en la comprensión de la biología de esta sencilla célula eucariótica.

Los genomas de *Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster* y otros invertebrados

Los genomas de *C. elegans* y *Drosophila* son genomas animales relativamente sencillos, intermedios en tamaño y complejidad entre las levaduras y los

humanos. Características distintivas de cada uno de estos organismos los convierte en modelos importantes para el análisis genómico: *C. elegans* ha sido utilizado ampliamente en estudios de desarrollo animales y *Drosophila* ha sido especialmente bien analizado genéticamente. Los genomas de estos organismos, sin embargo, son aproximadamente diez veces mayores que los de levaduras, introduciendo un nuevo orden de dificultad en el mapeo y la secuenciación genética. La determinación de la secuencia de *C. elegans* en 1998 representó, por tanto, un hito importante en el análisis genómico, que extendió la secuenciación genómica desde los organismos unicelulares (bacterias y levaduras) a un organismo multicelular reconocido como modelo importante del desarrollo animal.

Las fases iniciales del análisis del genoma de *C. elegans* se utilizaron fragmentos de ADN clonados en cósmidos, que situaron inserciones de ADN de unas 30-45 kb (véase Tabla 4.3). Este paso, sin embargo, no fue capaz de cubrir el genoma completo, con lo que fue sustituido por la clonación de piezas de ADN mucho más largas en vectores de **cromosomas artificiales de levaduras** (**YAC**; del inglés, *yeast artificial chromosome*). Como se ha descrito en el Capítulo 4, la única característica de los YAC, es que contienen centrómeros y telómeros, permitiendo su replicación como cromosomas lineales en levaduras. Se pueden utilizar, por tanto, para clonar fragmentos de ADN del tamaño del ADN cromosómico de las levaduras-miles de kilobases de longitud. Las inserciones de largos fragmentos de ADN clonados en los YAC son esenciales en el mapeo de genomas complejos.

El genoma de C. *elegans* comprende 97×10^6 pares de bases y contiene 19.000 supuestas secuencias codificadoras de proteínas —aproximadamente tres veces el número de genes en levaduras (Fig. 5.26)—. Al contrario de la organización compacta del genoma de levaduras, los genes en *C. elegans* se extienden unas 5 kilobases y contienen una media de cinco intrones. Las secuencias codificadoras de proteínas representan, por tanto, solamente el 25% del genoma de *C. elegans*, comparado con el 60%-70% de las levaduras y cerca del 90% de los genomas bacterianos.

Aproximadamente el 40% de las supuestas proteínas de *C. elegans* muestra similitudes significativas con las proteínas conocidas de otros organismos. Como se esperaba, existen más similitudes entre las proteínas de *C. elegans* y de los humanos que entre *C. elegans* y las levaduras o bacterias. Las proteínas que son comunes entre *C. elegans* y levaduras podrían funcionar en los procesos celulares básicos compartidos por estos organismos, como el metabolismo, replicación del ADN, transcripción, traducción y clasificación de proteínas. Estos procesos biológicos esenciales parecen estar llevados a cabo por un número parecido de genes en ambos organismos.

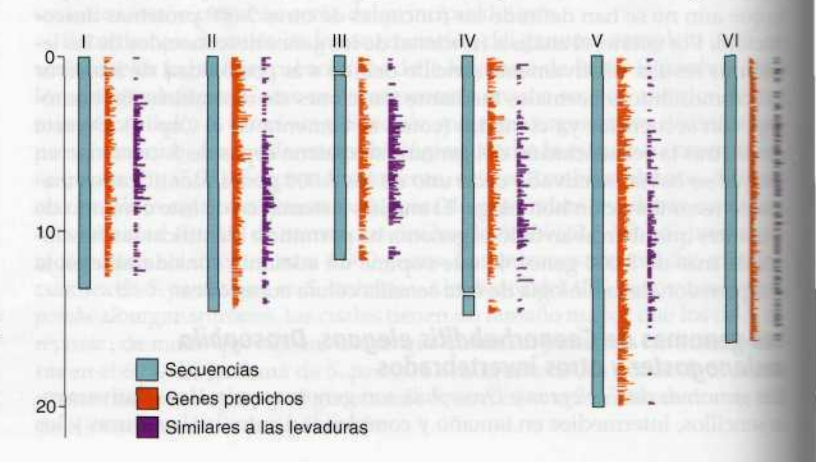


Figura 5.26 El genoma de *C. elegans*. Las posiciones predichas de los genes de *C. elegans* sobre cada cromosoma están indicadas por barras rojas. Aquellas que son similares a los genes de levaduras se indican en violeta. (De The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998. *Science* 282:2012.)

siendo posible que estos genes sean compartidos por todas las células eucariotas. Por el contrario, la mayoría de los genes de *C. elegans* no se encuentran en levaduras y funcionan en las actividades reguladoras más complicadas necesarias para el desarrollo de los organismos multicelulares. El descubrimiento de estos genes parece ser particularmente excitante en términos del conocimiento del desarrollo animal. Aunque los adultos de la especie *C. elegans* tienen una longitud aproximada de 1 mm y contienen solamente 959 células somáticas en el cuerpo entero, presentan todas las células especializadas que se puedan encontrar en animales más complicados. Además, se ha descrito el patrón completo de las divisiones celulares que conducen al desarrollo de *C. elegans*, incluyendo el análisis de las conexiones hechas por 302 neuronas en el animal adulto. Muchos de los genes involucrados en el desarrollo y diferenciación de *C. elegans* se ha encontrado que están relacionados con genes implicados en el control de la diferenciación y proliferación de las células de los mamíferos, sustentando la validez de *C. elegans* como modelo de animales más complejos. Sin ninguna duda, los estudios de secuenciación del genoma de *C. elegans* seguirán descubriendo genes primordiales en el control del desarrollo celular.

Drosophila es otro modelo clave para el desarrollo animal, el cual ha sido descrito genéticamente en detalle. Las ventajas de *Drosophila* para el análisis genético incluyen su genoma relativamente simple y el hecho de que puede ser mantenida y criada en el laboratorio. Además, *Drosophila* aporta un instrumento especial para el análisis genético en los **cromosomas politénicos** gigantes que se encuentran en algunos tejidos como las glándulas salivares de la larva. Los cromosomas se forman en las células que no se dividen como consecuencia de la replicación repetitiva de las hebras de ADN que no se pueden separar la una de la otra. Por tanto, cada cromosoma politénico contiene cientos de moléculas de ADN idénticas alienadas en paralelo. Debido a su tamaño, estos cromosomas politénicos son visibles al microscopio óptico, y con técnicas de tinción apropiadas se puede distinguir un patrón de bandas que constituye un mapa físico de gran resolución del genoma de *Drosophila*. La deleción de genes se puede relacionar con la pérdida de una banda cromosómica específica, definiendo por tanto la localización física del gen en el cromosoma. Además, los ADN clonados pueden mapearse por hibridación *in situ* de los cromosomas politénicos, con frecuencia con una resolución suficiente para localizar los genes clonados en las bandas específicas (Fig. 5.27). Por tanto, las posiciones en el mapa de los clones de cósmidos o de los YAC (que ocupan muchas bandas) pueden determinarse con facilidad, proporcionando la base para el análisis de la secuencia genómica.

Debido al poder de la genética de *Drosophila*, la secuenciación completa del genoma de *Drosophila* al comienzo del año 2000 fue uno de los pasos más importantes en el análisis genómico. El genoma de *Drosophila* consiste en 180×10^6 pares de bases, de las que un tercio es heterocromatina. La heterocromatina consiste principalmente en repeticiones satélite de secuencia sencilla, además de elementos transponibles dispersos, y no se incluyó en la secuenciación genómica. Las restantes 120×10^6 pares de bases de eucromatina fueron secuenciadas empleando una combinación de clones de **cromosomas bacterianos artificiales (BAC)**, que portan grandes insertos de ADN (véase Tabla 4.3), y un método de escopeta en el que pequeños fragmentos de ADN son clonados al azar y secuenciados en vectores plasmídicos. Las secuencias de estos pequeños fragmentos de ADN fueron organizadas a continuación en una larga secuencia contigua mediante la identificación de secuencias comunes entre fragmentos, y estas organizaciones de secuencias alineadas con los clones BAC para dar lugar a una secuencia completa de la porción eucromática del genoma de *Drosophila*.

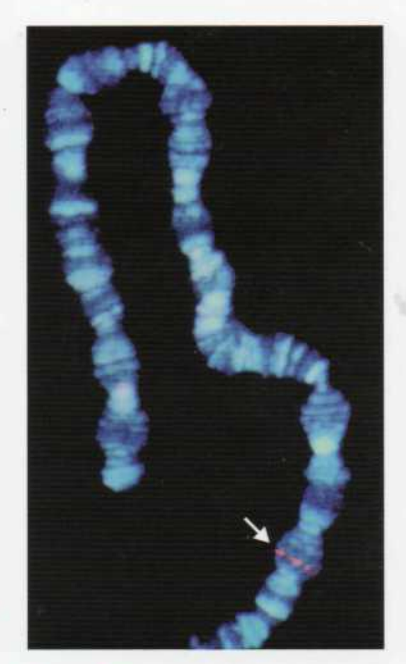


Figura 5.27 Hibridación *in situ* de un cromosoma politénico de *Drosophila*. Se ilustra la hibridación de un clon de YAC con un cromosoma politénico. La región de la hibridación se indica con una flecha. (Cortesía de Daniel L. Hartl, Harvard University.)

El genoma de *Drosophila* contiene unos 14.000 genes. Al igual que *C. elegans*, los genes de *Drosophila* contienen un número medio de cuatro intrones y la cantidad total de secuencias intrónicas es semejante a la cantidad de secuencias exónicas. En total, las secuencias que codifican proteínas representan cerca del 13% del genoma de *Drosophila*.

La identificación de un número de genes en *Drosophila* significativamente más bajo que en *C. elegans* resultó sorprendente debido a su mayor complejidad. Por otra parte, parece asombroso que el número de genes de un animal complejo tan solo duplique el identificado en las levaduras. Estas observaciones indican que la complejidad biológica de un organismo no depende exclusivamente del número de genes presentes en su genoma. Una proporción importante de la mayor complejidad de *Drosophila* y *C. elegans* podría residir en el mayor tamaño y el mayor número de dominios funcionales de sus proteínas en comparación con las de levadura. No cabe duda que el análisis funcional más detallado de los genomas de *Drosophila* y *C. elegans* nos ayudará a comprender mejor los mecanismos a través de los cuales sus genes controlan los complejos procesos de desarrollo animal.

Se han publicado las secuencias genómicas de otros invertebrados con posterioridad a la secuenciación genómica de *C. elegans* y *D. melanogaster*, como el genoma del nematodo *Caenorhabditis briggsae* (un organismo muy relacionado con *C. elegans*) y los de otras 11 especies de *Drosophila*, todos los cuales resultan de gran utilidad en el análisis comparativo de microorganismos con una estrecha relación filogenética. Se han secuenciado los genomas de otros insectos, como los del mosquito, el gusano de seda y la abeja. Asimismo, se han determinado las secuencias genómicas del erizo de mar y la anémona de mar, que contendrían entre 23.000 y 18.000 genes, respectivamente, lo que se pone de manifiesto una vez que el número de genes no se correlaciona directamente con la complejidad de un organismo.

Genomas de plantas

Al completar la secuencia del genoma de *Arabidopsis thaliana* en el año 2000 se extendió la secuenciación genómica de los animales a los vegetales, y fue, por tanto, un hecho muy importante en la biología vegetal. *Arabidopsis thaliana* es una planta sencilla, fanerógama, ampliamente utilizada como modelo en estudios de biología molecular y del desarrollo de plantas. Sus ventajas como organismo modelo para la biología molecular y la genética incluyen su genoma relativamente pequeño de aproximadamente 125×10^6 pares de bases, similar en tamaño a los genomas de *C. elegans* y *Drosophila*. Al igual que el genoma de *Drosophila*, el genoma de *Arabidopsis* fue secuenciado principalmente mediante el uso de vectores BAC para acomodar grandes insertos de ADN.

Sorprendentemente, el análisis del genoma de *Arabidopsis* indicaba que contenía aproximadamente 26.000 genes codificantes de proteína —significativamente más genes que los encontrados en *C. elegans* o en *Drosophila*—. Sin embargo, este número inesperadamente elevado de genes se debe, al menos en parte, a duplicaciones de grandes segmentos del genoma de *Arabidopsis*. Por el contrario, parece que el elevado número de genes de *Arabidopsis* es el resultado de duplicaciones de grandes segmentos del genoma de *Arabidopsis*. Estas duplicaciones implican aproximadamente a un 60% del genoma, de modo que el número de genes codificantes de proteína diferentes en *Arabidopsis* se estima en torno a unos 16.000.

La densidad génica de *Arabidopsis* también es similar a la de *C. elegans*, con secuencias codificantes de proteína responsables de aproximadamente el 25% del genoma de *Arabidopsis*. Como media, los genes de *Arabidopsis* tienen aproximadamente 4 intrones, y la longitud total de las secuencias intrónicas es aproximadamente igual a la longitud total de las secuencias exóni-

cas. Los elementos transponibles constituyen un 10% del genoma de *Arabidopsis*. Al igual que en *Drosophila*, las repeticiones de elementos transponibles se encuentran agrupadas en los centrómeros junto con las secuencias repetitivas satélite.

Un análisis comparativo de las funciones de los genes de *Arabidopsis* ha revelado tanto similitudes como diferencias interesantes entre los genes de animales y plantas. Los genes de *Arabidopsis* implicados en procesos celulares fundamentales como la replicación del ADN, reparación, transcripción, traducción y tráfico de proteínas son similares a los de las levaduras, *C. elegans* y *Drosophila*, reflejando el origen evolutivo común de todas las células eucarióticas. Por el contrario, los genes de *Arabidopsis* que codifican proteínas implicadas en procesos como la señalización celular y el transporte de membrana son bastante diferentes de los de las células animales, lo que es paralelo a las grandes diferencias en cuanto a fisiología y desarrollo entre animales y plantas. Aproximadamente una tercera parte de todos los genes de *Arabidopsis* parecen ser exclusivos de las plantas, ya que no se encuentran en los genomas de levaduras y animales. El grupo funcional mayor de genes de *Arabidopsis*, correspondiente a un 22% del genoma, codifica proteínas implicadas en el metabolismo y la fotosíntesis (Fig. 5.28). Otro grupo grande de genes (12% del genoma) codifican proteínas implicadas en las defensas de la planta. También resulta notable el hecho de que *Arabidopsis* codifica más de 3.000 proteínas que regulan la transcripción (correspondiendo a un 17% del genoma). Este número de proteínas reguladoras génicas (factores de transcripción) es dos o tres veces superior al encontrado en *Drosophila* y *C. elegans*, respectivamente. Muchos de los factores de transcripción de *Arabidopsis* son exclusivos para plantas, reflejando presumiblemente las características distintas de la expresión génica en el desarrollo de las plantas y en la respuesta de las plantas a su entorno.

La secuencia de *Arabidopsis* fue seguida, en el año 2002, por la publicación de dos secuencias borrador del genoma del arroz y en 2005 se presentó una secuencia completa de gran calidad. El genoma del arroz se compone de alrededor de 390×10^6 pares de bases de ADN: unas tres veces mayor que el genoma de *Arabidopsis*. Al menos el 35% del genoma del arroz se compo-

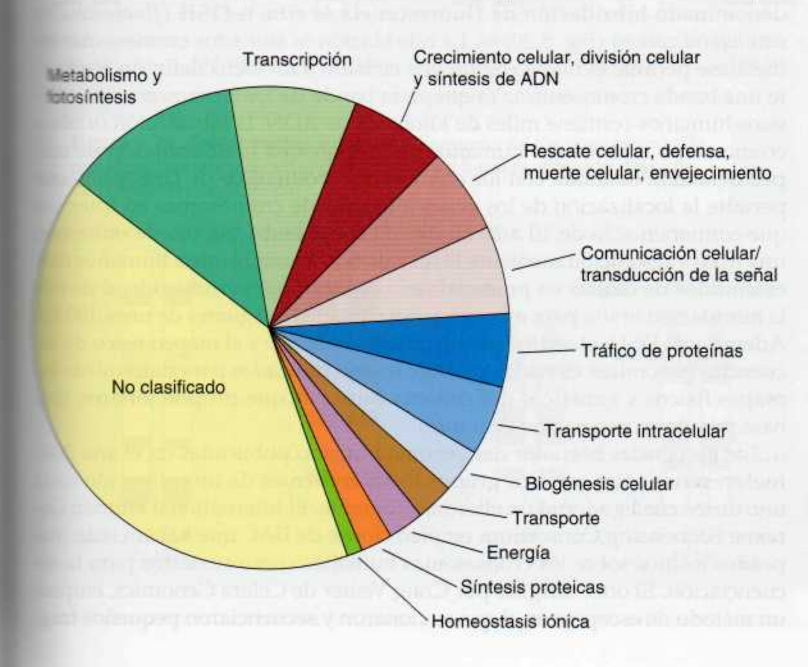


Figura 5.28 Funciones de los genes predichos de *Arabidopsis thaliana*. El diagrama ilustra la proporción de *Arabidopsis* en diferentes categorías funcionales. (De The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000. *Nature* 408:796.)

ne de elementos transponibles que son responsables, en parte, de su mayor tamaño. Por otra parte, el arroz contiene un número muy alto de genes que codifican proteínas, estimado en unos 41.000. El tercer genoma vegetal secuenciado, el del álamo negro, también cuenta con un número elevado de genes que podría superar los 45.000.

Por consiguiente, no resulta sorprendente que el número de genes de las plantas sea mucho mayor que el de los animales. Al igual que *Arabidopsis*, los genomas del arroz y álamo negro contienen muchos genes duplicados que han surgido como resultado de la duplicación de grandes segmentos genómicos y dan lugar a estos altos números de genes. Por otra parte, el gran número de genes de las plantas podría reflejar otras características de su biología que podrían identificarse mediante análisis funcionales más detallados.

Genoma humano

Para muchos científicos, el objetivo final del análisis genómico era la determinación de la secuencia completa de nucleótidos del genoma humano: aproximadamente 3×10^9 pares de bases de ADN. Para comprender la magnitud de este objetivo, recuerde que el genoma humano es más de diez veces mayor que el de *Drosophila*; que el cromosoma humano más pequeño es varias veces superior al genoma completo de levaduras; y que la longitud extendida del ADN que compone el genoma humano es de aproximadamente 1 m de largo. Partiendo de todas estas perspectivas, la determinación de la secuencia del genoma humano fue un trabajo fenómeno, y su publicación en forma de borrador en el año 2001 se ha considerado como un logro científico de magnitud histórica.

El genoma humano se distribuye a lo largo de 24 cromosomas (22 autosomas y dos cromosomas sexuales), donde cada uno contiene entre 45 y 280 Mb de ADN (Fig. 5.29). Antes de la determinación de la secuencia del genoma, varios miles de genes humanos habían sido identificados y mapeados en posiciones de los cromosomas humanos. Un método empleado con frecuencia para localizar genes es la hibridación *in situ* de sondas marcadas con colorantes fluorescentes a los cromosomas —un método generalmente denominado **hibridación de fluorescencia *in situ***, o **FISH** (*fluorescent in situ hybridization*) (Fig. 5.30)—. La hibridación *in situ* a los cromosomas en metafase permite el mapeo de un gen clonado a un locus definido mediante una banda cromosómica. Ya que cada banda de los cromosomas metafásicos humanos contiene miles de kilobases de ADN, la hibridación *in situ* a cromosomas metafásicos humanos no proporciona la información de mapeo detallada obtenida con los cromosomas politénicos de *Drosophila*, que permite la localización de los genes a bandas de cromosomas en interfase que contienen sólo de 10 a 20 kb de ADN. Sin embargo, puede obtenerse una mayor resolución mediante la hibridación a cromosomas humanos más extendidos de células en prometafase o en interfase, permitiendo el uso de la hibridación *in situ* para mapear genes clonados a regiones de unas 100 kb. Además del FISH, el análisis de ligamiento genético y el mapeo físico de secuencias genómicas clonadas y ADNc fueron utilizados para determinar los mapas físicos y genéticos del genoma humano, que proporcionaron una base para la secuenciación genómica.

Las secuencias borrador del genoma humano publicadas en el año 2001 fueron producidas por dos grupos independientes de investigación cada uno de los cuales adoptó un abordaje diferente. El International Human Genome Sequencing Consortium empleó clones de BAC que habían sido mapeados a sitios sobre los cromosomas humanos como sustratos para la secuenciación. El otro, dirigido por Craig Venter de Celera Genomics, empleó un método de escopeta en el que se clonaron y secuenciaron pequeños frag-

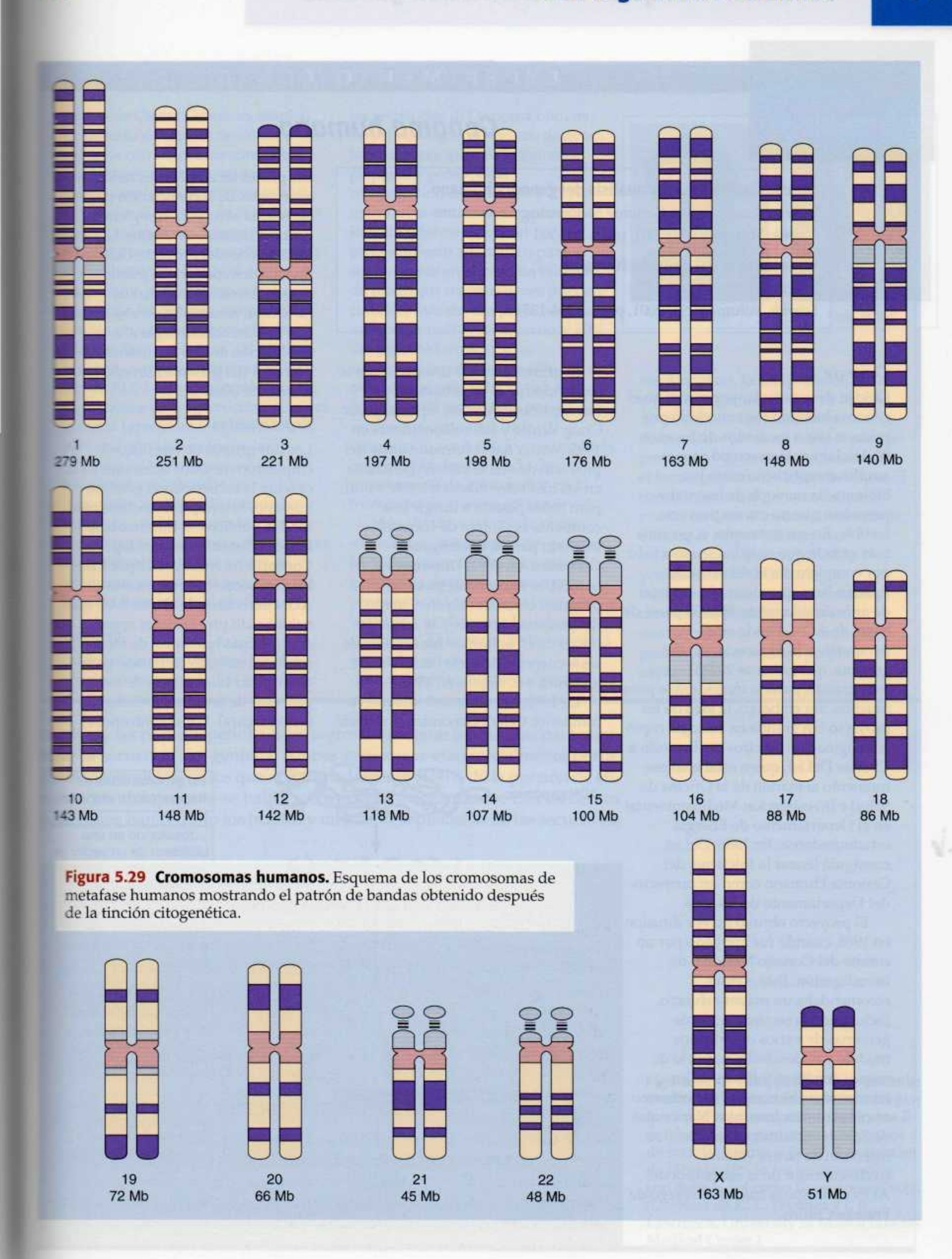


Figura 5.29 Cromosomas humanos. Esquema de los cromosomas de metafase humanos mostrando el patrón de bandas obtenido después de la tinción citogenética.



EXPERIMENTO CLAVE

Genoma humano

Secuenciación inicial y análisis del genoma humano
International Human Genome Sequencing Consortium
Nature, Volumen 409, 2001, págs. 860-921

La secuencia del genoma humano
J. Craig Venter y otros 273
Science, Volumen 291, 2001, págs. 1304-1351

Contexto

La idea de secuenciar por completo el genoma humano fue concebida por primera vez a mediados de los años 80. Inicialmente se acogió con un amplio escepticismo entre los biólogos, la mayoría de los cuales pensaban que no era un proyecto factible. En ese momento, el genoma más grande que se había secuenciado por completo era el del virus de Epstein-Barr, que alcanzaba un total de aproximadamente 180.000 pares de bases de ADN. Desde esta perspectiva, la secuenciación del genoma, que era unas 20.000 veces más grande, parecía inconcebible para muchos. Sin embargo, la idea de un proyecto tan grande en biología captó la imaginación de otros, incluyendo a Charles DeLisi, quien estaba en ese momento al mando de la Oficina de Salud e Investigación Medioambiental en el Departamento de Energía estadounidense. En 1986, DeLisi consiguió lanzar la Iniciativa del Genoma Humano como un proyecto del Departamento de Energía.

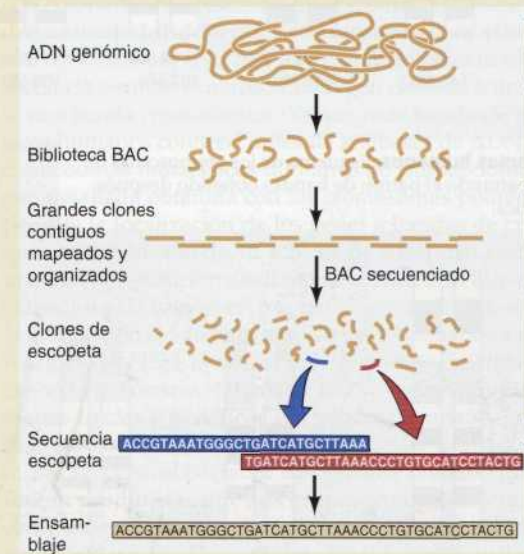
El proyecto obtuvo mayor difusión en 1988, cuando fue apoyado por un comité del Consejo Nacional de Investigación. Este comité recomendaba un mayor esfuerzo, incluyendo la secuenciación de genomas de varios organismos modelo y el desarrollo paralelo de mapas genéticos y físicos de los cromosomas humanos. Este esfuerzo se centró en los Institutos Nacionales de Salud, inicialmente bajo la dirección de James Watson (codescubridor de la estructura del ADN), y después bajo el liderazgo de Frances Collins.

El primer genoma completo que se secuenció fue el de la bacteria *Haemophilus influenzae*, reportado por Craig Venter y sus colaboradores en 1995. Venter había formado parte del proyecto de secuenciación genómica en los Institutos Nacionales de Salud, pero había pasado a dirigir una compañía sin ánimo de lucro, el Instituto para la Investigación Genómica, en 1991. Durante este tiempo, se había conseguido un progreso considerable en el mapeo del genoma humano, y la secuencia inicial de *H. influenzae* fue seguida de las secuencias de otras bacterias, levadura y *C. elegans* en 1998.

En 1998, Venter formó una nueva compañía, Celera Genomics, y anunció sus planes de emplear tecnologías avanzadas de secuenciación para obtener la secuencia completa del genoma humano en 3 años. Collins y otros líderes del Proyecto Genoma financiados con fondos públicos respondieron acelerando sus esfuerzos, resultando en una carrera que finalmente dio lugar a la publicación de dos secuencias borrador del genoma humano en febrero de 2001.

Experimentos

Los dos grupos de científicos emplearon métodos diferentes para obtener la secuencia del genoma humano. El equipo financiado con fondos públicos, el International Human Genome Sequencing Consortium, encabezado por Eric Lander, secuenció fragmentos de ADN derivados de clones BAC que habían sido previamente apeados a cromosomas humanos, de forma similar al método empleado para determinar la secuencia de los genomas de levadura y *C. elegans* (véase figura). Por el contrario, el



Estrategia para la secuenciación genómica mediante clones de BAC que habían sido organizados en grupos solapantes (contiguos) y mapeados a cromosomas humanos.

EXPERIMENTO CLAVE

equipo de Celera Genomics empleó un método de secuenciación de escopeta con el genoma completo, que Venter y sus colaboradores habían empleado previamente para secuenciar el genoma de *H. influenzae*. En este método, los fragmentos de ADN se secuencian aleatoriamente, y se emplearon repeticiones entre fragmentos para recomponer una secuencia del genoma completo. Ambas secuencias cubren sólo la porción de eucromatina del genoma humano —aproximadamente 2.900 Mb de ADN— con la porción rica en repeticiones de la heterocromatina del genoma (aproximadamente 300 Mb) permaneciendo sin secuenciar.

Ambas de estas versiones inicialmente publicadas eran borradores, en lugar de secuencias completas. Esfuerzos posteriores completaron la secuencia, dando lugar a la publicación de una secuencia altamente precisa de la secuencia del genoma humano en el año 2004.

Impacto

Inmediatamente surgieron muchas conclusiones importantes a partir de las secuencias del genoma humano. En primer lugar, el número de genes humanos era sorprendentemente pequeño y parece estar comprendido entre 20.000 y 25.000 genes en la secuencia completada. Resulta interesante que el procesamiento alternativo parece ser frecuente en el genoma humano, de modo que muchos genes pueden codificar más de una proteína. Los intrones constituyen en torno al 20% del genoma humano, y las secuencias repetitivas un 60%. Es notable que más del 40% del ADN humano está compuesto por secuencias derivadas de la transcripción inversa, lo que resalta la importancia de este modo de transferencia de información en la formación de nuestro genoma.

Más allá de estas conclusiones inmediatas, la secuencia del genoma humano, junto con las secuencias genómicas de otros organismos, proporcionará una nueva base para la biología y medicina en los años venideros. El impacto de la secuencia genómica se sentirá en el descubrimiento de nuevos genes y sus funciones, la comprensión de la regulación génica, descubrir la base de enfermedades humanas y desarrollar nuevas estrategias para la prevención y tratamiento basados en el fondo genético de los individuos. El conocimiento del genoma humano puede, en última instancia, contribuir a alcanzar lo que Venter y sus colaboradores denominan «El verdadero reto de la biología humana... explicar cómo nuestras mentes han llegado a organizar suficientemente sus pensamientos para investigar nuestra propia existencia».


Eric Lander


Craig Venter

mentos, y las partes repetidas entre segmentos fueron empleadas para organizar la secuencia del genoma. Ambas secuencias eran inicialmente borradores incompletos, en los que aproximadamente el 90% de la porción de eucromatina del genoma se había secuenciado y organizado. Los esfuerzos posteriores han cerrado los huecos y mejorado la precisión de las secuencias

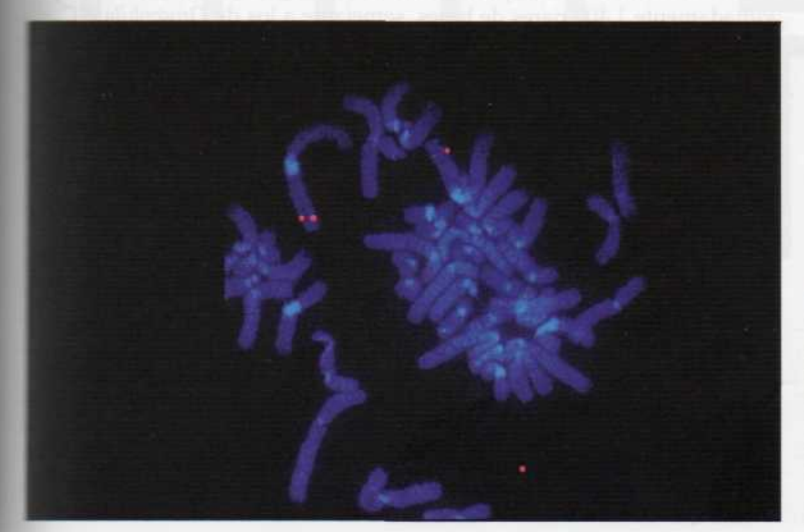


Figura 5.30 Hibridación fluorescente *in situ*. Una sonda fluorescente del gen que codifica el receptor de la lámina B se hibrida con cromosomas humanos de metafase teñidos (azul). Las señales de hibridación de los genes simples son detectadas como fluorescencia roja. (Cortesía de K. L. Wydner y J. B. Lawrence, University of Massachusetts Medical Center.)

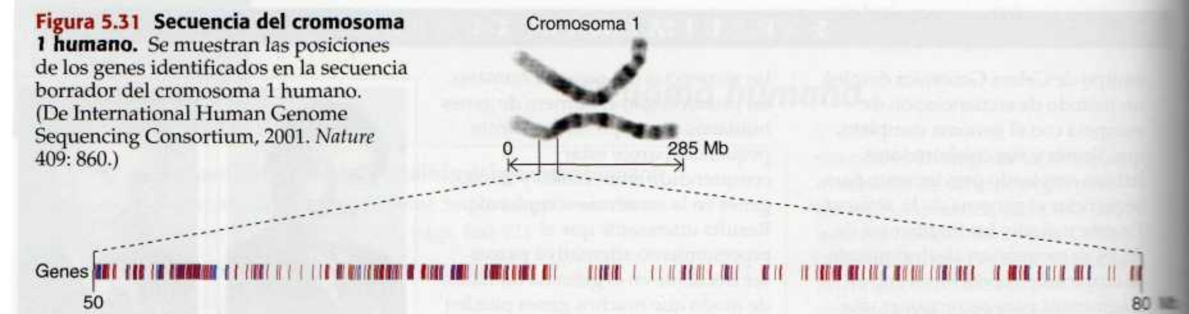


Figura 5.31 Secuencia del cromosoma 1 humano. Se muestran las posiciones de los genes identificados en la secuencia borrador del cromosoma 1 humano. (De International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. *Nature* 409: 860.)

borrador, dando lugar a la publicación de una secuencia del genoma humano de alta calidad en el año 2004.

La porción de eucromatina genómica secuenciada incluye aproximadamente $2{,}9 \times 10^6$ kb de ADN (Fig. 5.31). El tamaño total del genoma es de aproximadamente $3{,}2 \times 10^6$ kb, donde el 10% restante del genoma ($0{,}3 \times 10^6$ kb) corresponde a secuencias altamente repetidas de la heterocromatina. Como se ha descrito antes en este capítulo, las secuencias repetitivas dispersas, la mayoría de las cuales son elementos transponibles que se han desplazado por el genoma mediante la transcripción inversa de intermediarios de ARN, forman aproximadamente el 45% de la secuencia de eucromatina humana. Otro 5% del genoma consiste en segmentos duplicados de ADN, de modo que en torno al 60% del genoma humano consiste en secuencias repetitivas de ADN.

Una gran sorpresa obtenida de las secuencias genómicas fue el número inesperadamente bajo de genes humanos. El genoma humano consiste de tan solo 20.000 a 25.000 genes, que no es mucho más grande que el número de genes en animales más sencillos como *C. elegans* o *Drosophila* y por debajo del número de genes en las plantas. Por otro lado, parece existir una gran cantidad de procesamiento alternativo en los genes humanos, permitiendo a un solo gen especificar más de una proteína (véase Fig. 5.5). A pesar de que el alcance del corte y empalme alternativo en humanos no está todavía claro, puede expandir sustancialmente el número de proteínas que puede codificar el genoma humano.

Los genes humanos se extienden sobre distancias mucho mayores y contienen más secuencias intrónicas que los genes de *Drosophila* y *C. elegans*. La secuencia codificadora de proteína media en los genes humanos es de aproximadamente 1.400 pares de bases, semejante a los de *Drosophila* o *C. elegans*. Sin embargo, el gen humano medio abarca unas 30 kb de ADN, donde más del 90% corresponde a intrones. Así, aproximadamente el 20% del genoma consiste en intrones, y sólo el 1,2% del genoma humano corresponde a secuencias codificadoras de proteínas.

Más del 40% de las proteínas humanas predichas están relacionadas con proteínas de otros organismos secuenciados, incluyendo a *Drosophila* y *C. elegans*. Muchas de estas proteínas conservadas funcionan en procesos celulares básicos, como el metabolismo, replicación y reparación del ADN, transcripción, traducción y tráfico proteico. La mayoría de las proteínas que son exclusivas del hombre se componen de dominios proteicos que también se encuentran en otros organismos, pero estos dominios se organizan en nuevas combinaciones para dar lugar a proteínas diferentes en humanos. Comparado con *Drosophila* y *C. elegans*, el genoma humano contiene números expandidos de genes implicados en funciones relacionadas con la mayor complejidad de los vertebrados, como la respuesta inmune, el sistema nervioso y la coagulación sanguínea, además de una elevación del número de genes implicados en el desarrollo, señalización celular y regulación de la transcripción.

■ **Durante muchos años, los científicos generalmente aceptaban una estimación de aproximadamente 100.000 genes en el genoma humano. Tras la publicación de la secuencia genómica borrador en el 2001, el número se redujo drásticamente a entre 30.000 y 40.000. Las estimaciones actuales, basadas en la secuencia de alta calidad publicada en el año 2004 y empleando herramientas informáticas mejoradas para identificar genes, reduce el número de genes humanos incluso más, hasta aproximadamente 20.000 a 25.000.**

Genomas de otros vertebrados

Además del genoma humano, un gran y creciente número de genomas de vertebrados ya se han secuenciado en los últimos años, incluyendo genomas de roedores, perros y primates (Fig. 5.32). Estas secuencias proporcionan comparaciones interesantes con el genoma humano y resultan de utilidad para identificar diferentes tipos de secuencias funcionales, como elementos reguladores que controlan la expresión génica.

El genoma del pez globo *Fugu rubripes* fue elegido para su secuenciación porque es sorprendentemente compacto para ser un genoma vertebrado. Consiste en sólo $3{,}7 \times 10^8$ pares de bases, el genoma del pez globo es de aproximadamente una octava parte del tamaño del genoma humano. Aunque los genomas del pez globo y el humano contienen un número similar de genes, el pez globo posee muchas menos secuencias repetidas e intrones más pequeños. En concreto, las secuencias repetidas constituyen sólo el 15% del genoma del pez globo (correspondiendo a aproximadamente 50 millones de pares de bases de ADN) en comparación con aproximadamente el 60% del genoma humano (aproximadamente 2 billones de pares de bases). Como consecuencia de esta cantidad reducida de secuencias repetidas, los genes se encuentran empaquetados más próximos en el pez globo, de

■ **El pez globo contiene una neurotoxina muy potente, denominada tetrodoxina, en algunos de sus tejidos. En Japón, el pez globo está considerado como una exquisitez y es preparado por cocineros especialmente preparados en restaurantes con licencias específicas.**

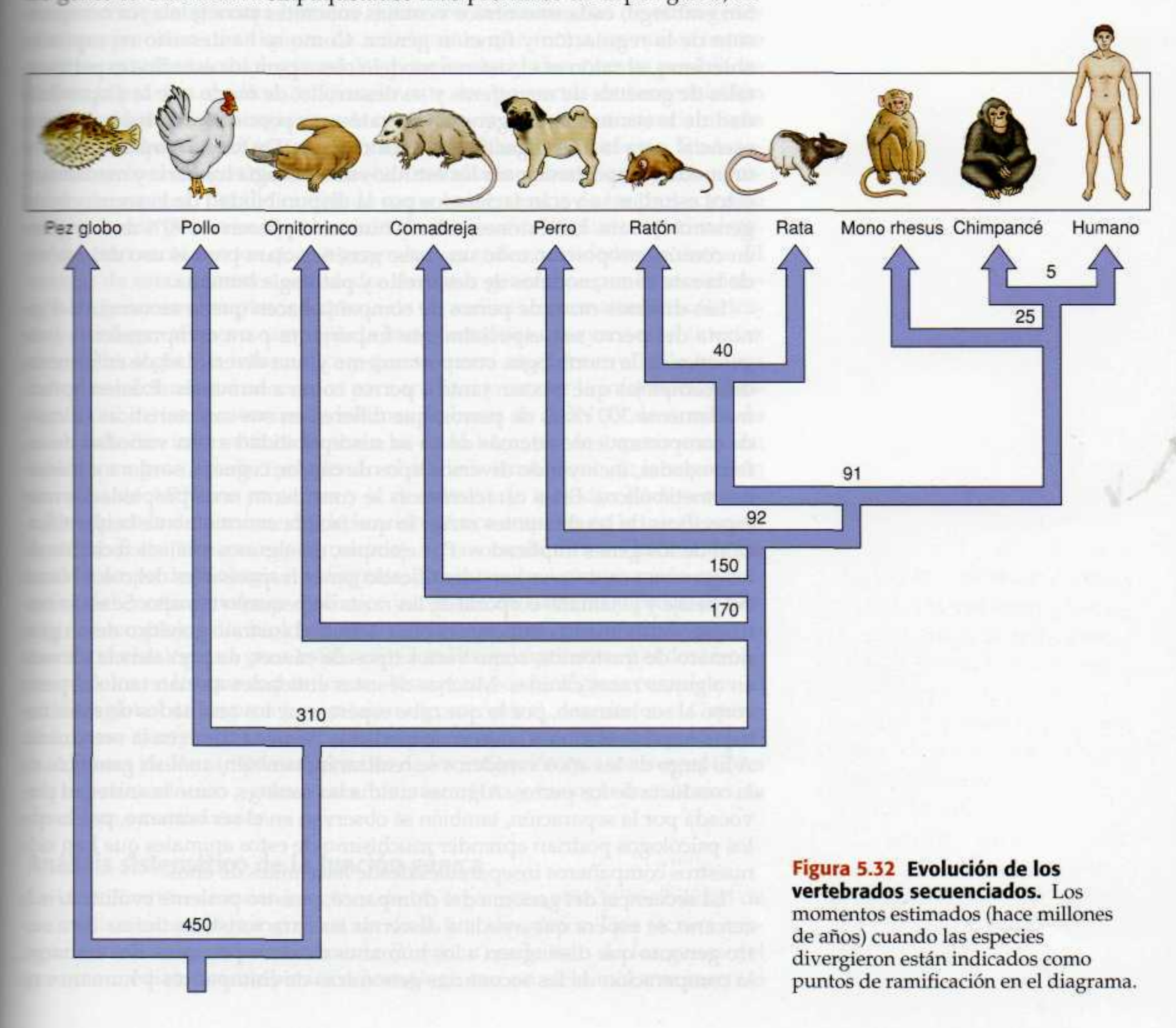


Figura 5.32 Evolución de los vertebrados secuenciados. Los momentos estimados (hace millones de años) cuando las especies divergieron están indicados como puntos de ramificación en el diagrama.

modo que la secuencia codificante de proteínas corresponde a aproximadamente una tercera parte del gen medio o aproximadamente el 10% del genoma del pez globo (en comparación con el 1,2% del genoma humano). El pez globo, por tanto, proporciona un modelo compacto de un genoma vertebrado en el que los genes y secuencias reguladoras críticas están muy concentrados, facilitando los esfuerzos para centrar los estudios sobre estos elementos genómicos funcionales.

El pollo es un intermedio entre el pez globo y los mamíferos, tanto en divergencia evolutiva como en tamaño de su genoma. Consiste en aproximadamente 10^9 pares de bases, el genoma del pollo es aproximadamente una tercera parte del tamaño del genoma humano. Sin embargo, se estima que contiene de 20.000 a 23.000 genes, un contenido similar al del genoma humano. El menor tamaño del genoma del pollo es principalmente el resultado de una reducción sustancial en la cantidad de secuencias repetidas y pseudogenes en comparación con los genomas de mamíferos.

Los genomas de mamíferos que han sido secuenciados, además del genoma humano, incluyen los genomas del ornitorrinco, la comadreja , la rata, el perro, el mono rhesus y el chimpancé. Estos genomas son similares en tamaño al genoma humano y contienen cantidades similares de genes. Sin embargo, cada uno ofrece ventajas concretas para la mayor comprensión de la regulación y función génica. Como se ha descrito en capítulos anteriores, el ratón es el sistema modelo clave para los estudios experimentales de genética de mamíferos y su desarrollo, de modo que la disponibilidad de la secuencia del genoma de ratón proporciona una base de datos esencial para la investigación en estos campos. De forma similar, la rata es un modelo importante para los estudios de fisiología humana y medicina, y estos estudios se verán facilitados por la disponibilidad de la secuencia del genoma de rata. Los ratones, ratas y humanos poseen un 90% de sus genes en común, proporcionando una base genética clara para el uso del ratón y de la rata como modelos de desarrollo y patología humana.

Las diversas razas de perros de compañía hacen que la secuencia del genoma del perro sea especialmente importante para comprender la base genética de la morfología, comportamiento y una diversidad de enfermedades complejas que afectan tanto a perros como a humanos. Existen aproximadamente 300 razas de perros, que difieren en sus características físicas y de comportamiento además de en su susceptibilidad a una variedad de enfermedades, incluyendo diversos tipos de cáncer, ceguera, sordera y trastornos metabólicos. Estas características se consideran unas propiedades muy específicas de las diferentes razas, lo que facilita enormemente la identificación de los genes implicados. Por ejemplo, en algunos análisis recientes de los genomas caninos se han identificado genes responsables del color blanco del pelaje y el tamaño corporal de las razas de pequeño tamaño. Se están realizando otros análisis semejantes para definir el sustrato genético de un gran número de trastornos, como varios tipos de cáncer, de prevalencia elevada en algunas razas caninas. Muchas de estas entidades afectan tanto al perro como al ser humano, por lo que cabe esperar que los resultados de estos trabajos sean beneficiosos tanto en la medicina humana como en la veterinaria. A lo largo de los años venideros se realizarán, también, análisis genéticos de la conducta de los perros. Algunas conductas caninas, como la ansiedad provocada por la separación, también se observan en el ser humano, por lo que los psicólogos podrían aprender muchísimo de estos animales que han sido nuestros compañeros inseparables desde hace miles de años.

La secuencia del genoma del chimpancé, nuestro pariente evolutivo más cercano, se espera que ayude a discernir las características únicas de nuestro genoma que distinguen a los humanos de otros primates. Sin embargo, la comparación de las secuencias genómicas de chimpancés y humanos no

sugiere una respuesta fácil a la cuestión de qué es lo que nos hace humanos. Las secuencias nucleotídicas de los genomas de chimpancé y humano son prácticamente idénticas en un 99%. La diferencia entre las secuencias de estas especies estrechamente relacionadas (aproximadamente 1 nucleótido de cada 100) es unas 10 veces mayor que la diferencia ente los genomas de seres humanos individuales (aproximadamente 1 nucleótido en cada 1.000). Quizá, sorprendentemente, las diferencias entre las secuencias de humanos y chimpancés no estén restringidas a las secuencias no codificantes. Por el contrario, frecuentemente alteran las secuencias codificantes de los genes, dando lugar a cambios en las secuencias de aminoácidos de la mayoría de las proteínas codificadas por chimpancés y humanos. A pesar de que muchos de estos cambios aminoacídicos no afecten a la función proteica, parece que hay modificaciones en la estructura además de en la expresión de miles de genes entre chimpancés y humanos, de modo que la identificación de dichas diferencias que es la clave al origen del ser humano no será una tarea sencilla.

Bioinformática y biología de sistemas

La secuencia del genoma humano, junto con las secuencias de otros genomas, proporciona una riqueza de información que forma un nuevo marco para los estudios de biología celular y molecular y abre nuevas posibilidades en la práctica médica. Adicionalmente, los proyectos de secuenciación genómica han hecho surgir nuevas cuestiones y cambiado sustancialmente el modo en que nos enfrentamos a muchos problemas en biología. Tradicionalmente, los biólogos moleculares han estudiado uno o pocos genes o proteínas de una vez. Esto ha cambiado como consecuencia de los proyectos de secuenciación genómica, que han introducido nuevas técnicas experimentales de gran escala en los que se generaban grandes cantidades de datos. El manejo de estas enormes cantidades de datos generados por la secuenciación de genomas completos requería de un análisis informatizado sofisticado y dio lugar al nuevo campo de la **bioinformática**, que yace en el interfaz entre la biología y la informática y que se centra en el desarrollo de nuevos métodos informáticos necesarios para analizar y extraer la información biológica útil de las secuencias de billones de bases de ADN. El desarrollo de estos métodos informáticos también ha dado lugar a más experimentación biológica a gran escala, incluyendo el análisis simultáneo de la expresión de miles de ARNm o proteínas y el desarrollo de métodos de alto rendimiento para la determinación de función génica empleando la interferencia de ARN. Estas técnicas experimentales a gran escala forman la base de un nuevo campo de **biología de sistemas**, que busca una comprensión cuantitativa del comportamiento dinámico integrado de sistemas y procesos biológicos complejos. La biología de sistemas combina, por tanto, la experimentación biológica a gran escala con el análisis cuantitativo y el desarrollo de modelos en los que se pueden analizar procesos biológicos complejos. El análisis global de las proteínas celulares (proteómica), descrito en el Capítulo 2, es un ejemplo de estas técnicas experimental/informática a gran escala. Algunos de los campos adicionales de investigación que son susceptibles a la experimentación a gran escala, bioinformática y biología de sistemas, se describen a continuación.

Análisis sistemático de la función génica

La identificación de todos los genes de un organismo abre la posibilidad de un análisis sistemático a gran escala de la función génica. Una técnica consiste en inactivar sistemáticamente (*knockout*) cada uno de los genes del genoma mediante recombinación homóloga con un alelo mutante inactivo

(véase Fig. 4.39). Como se indicó en el Capítulo 4, esto se ha realizado en levaduras para producir una colección de cepas de levadura con mutaciones en todos los genes conocidos, que pueden analizarse a continuación para determinar qué genes están implicados en cualquier característica biológica de interés. Se está llevando a cabo un proyecto internacional a gran escala de inactivación sistemática de todos los genes del ratón. Alternativamente, los análisis a gran escala basados en la interferencia de ARN (ARNi) se emplean para diseccionar sistemáticamente la función génica en una variedad de organismos, incluyendo *Drosophila*, *C. elegans* y células de mamífero en cultivo.

En los análisis de ARNi, se emplean ARN de doble hebra para inducir la degradación de ARNm homólogos en células (véase Fig. 4.42). Con la disponibilidad de las secuencias genómicas completas, pueden diseñarse bibliotecas de ARN de doble hebra y emplearse en análisis que abarcan todo el genoma para identificar todos los genes implicados en cualquier proceso biológico que puede estudiarse en un estudio de alto rendimiento. Por ejemplo, el análisis de ARNi de todo el genoma puede utilizarse para identificar los genes necesarios para el crecimiento y viabilidad de células de *Drosophila* o de mamífero en cultivo (Fig. 5.33). ARN de doble hebra individuales de la biblioteca de genoma completo se ensayan en micropocillos en un formato de alto rendimiento para identificar a aquellos que interfieren con el crecimiento de células cultivadas, caracterizando así todo el conjunto de genes que son necesarios para el crecimiento o la supervivencia celulares en ciertas condiciones. Análisis de ARNi similares se han empleado para identificar genes implicados en una diversidad de procesos biológicos, incluyendo vías de señalización celular, degradación proteica y transmisión en las sinapsis del sistema nervioso.

Regulación de la expresión génica

Las secuencias genómicas pueden, en principio, desvelar no solo las secuencias codificadoras de proteína de los genes, sino también los elementos reguladores que controlan la expresión génica. Como se analizará en capítulos siguientes, la regulación de la expresión génica es crítica para muchos

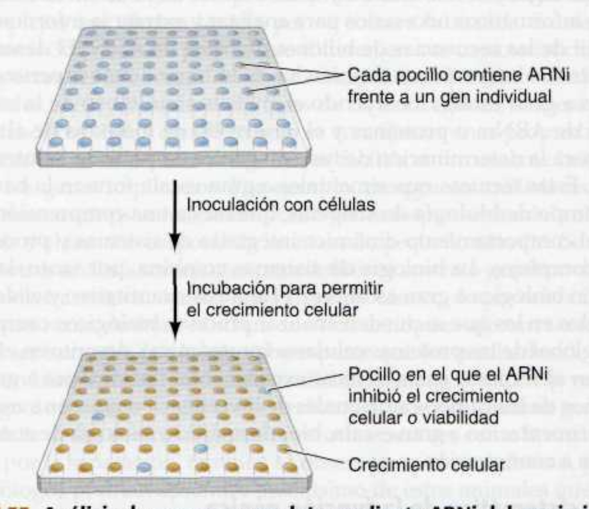


Figura 5.33 Análisis de genoma completo mediante ARNi del crecimiento celular y la viabilidad. Cada micropocillo contiene ARNi que corresponde a un gen individual del genoma. El cultivo tisular de células es añadido a cada pocillo e incubado para permitir el crecimiento celular. Los pocillos en los que no puedan crecer las células identifican a los genes necesarios para el crecimiento celular o viabilidad.

aspectos de la función celular, incluyendo el desarrollo de complejos organismos multicelulares. La comprensión de los mecanismos que controlan la expresión génica como la transcripción y el procesamiento alternativo es, por tanto, un objetivo central en la biología celular y molecular actual, y se espera que la disponibilidad de secuencias genómicas contribuirán sustancialmente a su consecución. Desafortunadamente, es mucho más difícil identificar las secuencias reguladoras de lo que es identificar las secuencias codificadoras de proteína. La mayoría de los elementos reguladores son secuencias cortas de ADN, abarcando generalmente tan solo unos 10 pares de bases. Como consecuencia, las secuencias que se parecen a secuencias reguladoras ocurren frecuentemente por azar en el ADN genómico, de modo que elementos fisiológicamente significativos no pueden identificarse simplemente a partir del ADN. La identificación de elementos reguladores funcionales y la dilucidación de redes de señalización que controlan la expresión génica representan, por tanto, grandes retos para la bioinformática y la biología de sistemas.

La disponibilidad de secuencias genómicas ha permitido a los científicos llevar a cabo estudios globales de expresión génica en los que los niveles de expresión de todos los genes en una célula pueden estudiarse simultáneamente. Estos experimentos emplean los *microarrays* de ADN en los que cada gen está representado por un oligonucleótido correspondiente a un pequeño punto del portaobjetos (véase Fig. 4.27). La hibridación de copias de ARNm en forma de ADNc marcado con un fluoróforo a este tipo de *microarray* permite la determinación simultánea de los niveles de ARNm de todos los genes celulares. Esta técnica ha resultado especialmente valiosa para revelar los cambios globales en la regulación génica asociados con comportamientos celulares concretos, como puede ser la diferenciación celular o la respuesta de células a una determinada hormona o factor de crecimiento. Puesto que los genes que están regulados de forma coordinada dentro de una célula, pueden estar controlados por mecanismos similares, el análisis de los cambios en la expresión en múltiples genes puede ayudar a determinar los elementos reguladores comunes.

Una variedad de enfoques informáticos también se están empleando para la caracterización funcional de los elementos reguladores. Uno de los enfoques es el análisis comparativo de secuencias genómicas de organismos relacionados. Esto se basa en asumir que las secuencias funcionalmente importantes están conservadas en la evolución, mientras que los segmentos no funcionales de ADN divergen con mayor rapidez. Los mamíferos conservan alrededor del 5% de la secuencia genómica; dado que una proporción cercana al 1,2% del genoma corresponde a secuencias que codifican proteínas, el 4% restante podría corresponder a secuencias reguladoras de importancia funcional. Por ejemplo, el análisis informático encaminado a la identificación de secuencias no codificantes conservadas en los genomas del ratón, la rata, el perro y la especie humana ha ayudado a definir las secuencias que controlan la transcripción génica (Fig. 5.34). Adicionalmente, los elementos reguladores funcionales a menudo se encuentran en grupos o *clusters*, reflejando el hecho de que los genes generalmente se encuentran regulados por interacciones de múltiples factores de transcripción (véase Cap. 7). También han resultado útiles los algoritmos informáticos diseñados para detectar grupos de sitios de unión de factores de transcripción en el ADN genómico, para la identificación de secuencias que regulan la expresión génica.

Como se comenta con mayor detalle en el Capítulo 7, se han puesto en marcha proyectos experimentales a gran escala de análisis genómico completo de los sitios de unión de proteínas reguladoras. La combinación de estos abordajes globales con el análisis informático ha permitido, al menos,

Humano CTGCCT-----AAGTAGCCTAGACGCTCCCGTGCG-CCCGGGGCGGG-TAG
Ratón CGCCGC-----CTGCATTATTCAC---------------------------
Rata CTGCTC-----ATGCATAATTCAC---------------------------
Perro CTGCTTTCAACAGTGGGGCAGACGGTCCCGCGCGCCCCAAGGCAGGCCCG

Err-α
Humano GCCTGGCCGAAAATCTCTCCCGCGCGCCTGACCTTGGGTTGCCCCAGCCA
Ratón ------------AAGCCTGTGGCGCGC-CGTGACCTTGGGCTGCCCCAGGCG
Rata ------------AAGTTTCT---CTGC-CCTGACCTTGGGTTGCCCCAGGCG
Perro GGCTGC-----AGACCTGCCCTGAGGGAATGACCTTGGGCGGCCGCAGCGG

Humano GGCTGCGGGCCCGAGACCCCCG--------------------GGCCTCCCT
Ratón GGCTGCAGGCTCACCACCCC---------------------GTCTTTTCT
Rata AG--GCATACACCCCGCCTT---------------------TTTTTTTTT
Perro GGCCGCGGGCCCAGGCCCCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT

Figura 5.34 Conservación de los elementos reguladores de la función génica. Secuencias próximas al sitio de inicio de la transcripción de un gen humano, de ratón, rata y perro, contienen un elemento regulador de la función que se une a la proteína reguladora de la transcripción Err-α. Estas secuencias (marcadas en amarillo) están conservadas en los cuatro genomas, mientras que las secuencias circundantes no lo están. (De X. Xie y cols., 2005. *Nature* 434: 338.)

delimitar algunos elementos reguladores de la transcripción que controlarían la expresión génica en levaduras. No obstante, la aplicación de estas técnicas a genomas mucho más complejos, como el del ser humano y otros mamíferos, continúa suponiendo un gran reto en los trabajos actuales de investigación.

Variación entre individuos y medicina genómica

Las comparaciones entre secuencias genómicas de especies relacionadas sirve de ayuda para la comprensión de la base de las diferencias entre especies, además de identificar genes y secuencias reguladoras que se han conservado en la evolución. Un tipo diferente de información puede obtenerse de la comparación de secuencias genómicas de diferentes individuos. Las variaciones entre genomas individuales son responsables de diferentes características físicas mentales, incluyendo la susceptibilidad a muchas patologías. Una de las principales aplicaciones de la secuencia genómica humana será el ayudar a descubrir nuevos genes implicados en muchas patologías que afectan a la humanidad, incluyendo el cáncer, las enfermedades cardíacas y las patologías degenerativas del sistema nervioso como la enfermedad de Parkinson y la de Alzheimer. Además, la comprensión de nuestra constitución genética como individuos se espera que dé lugar al desarrollo de nuevas estrategias hechas a medida para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades.

Recientemente se han definido las secuencias genómicas completas de varias personas, como Craig Venter y James Watson, y cabe esperar que la secuenciación genómica individual forme parte de la medicina del futuro. El genoma de Watson se secuenció por medio de nuevas técnicas caracterizadas por una rapidez mucho mayor y un coste notablemente más bajo que los métodos tradicionales de secuenciación del ADN, y se espera que los adelantos tecnológicos continuos hagan posible, en última instancia, la determinación de ciertas secuencias genéticas a un precio asequible.

Además de la secuenciación genómica completa, los métodos de análisis genómico a gran escala han hecho posible la identificación de genes vincu-

ados con la susceptibilidad a diversos trastornos comunes. Los genomas de dos personas no relacionadas difieren en alrededor de una de cada mil bases. Gran parte de esta variación se manifiesta en forma de sustituciones de una sola base, conocidas como polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP), que aparecen en unos 10 millones de posiciones en el genoma. Se ha cartografiado más de un millón de SNP frecuentes en el genoma humano. Su distribución en él es relativamente uniforme, por lo que pueden utilizarse como marcadores separados por unas 5 kb a lo largo del genoma. En los **análisis de asociaciones del genoma completo** se han empleado SNP para identificar genes asociados con diferencias hereditarias en la susceptibilidad a algunas enfermedades frecuentes, como la artritis reumatoide, la hipertensión, la enfermedad intestinal inflamatoria, la manía depresiva, la enfermedad arterial coronaria, la diabetes, el asma, el cáncer de mama y el cáncer de próstata. En estos experimentos se hibridan los ADN de millones de pacientes y sujetos sanos con *microarrays* que contienen ambos alelos de hasta 500.000 SNP comunes (Fig. 5.35). Si existe una asociación entre un gen

■ **Los esfuerzos actuales tienen como objetivo desarrollar tecnologías que puedan ser capaces de secuenciar el genoma de individuos a bajo coste. Este tipo de «proyectos genoma personales» de bajo coste podrían proporcionar mejores opciones de cuidados médicos, diseñados para las necesidades de pacientes individuales.**

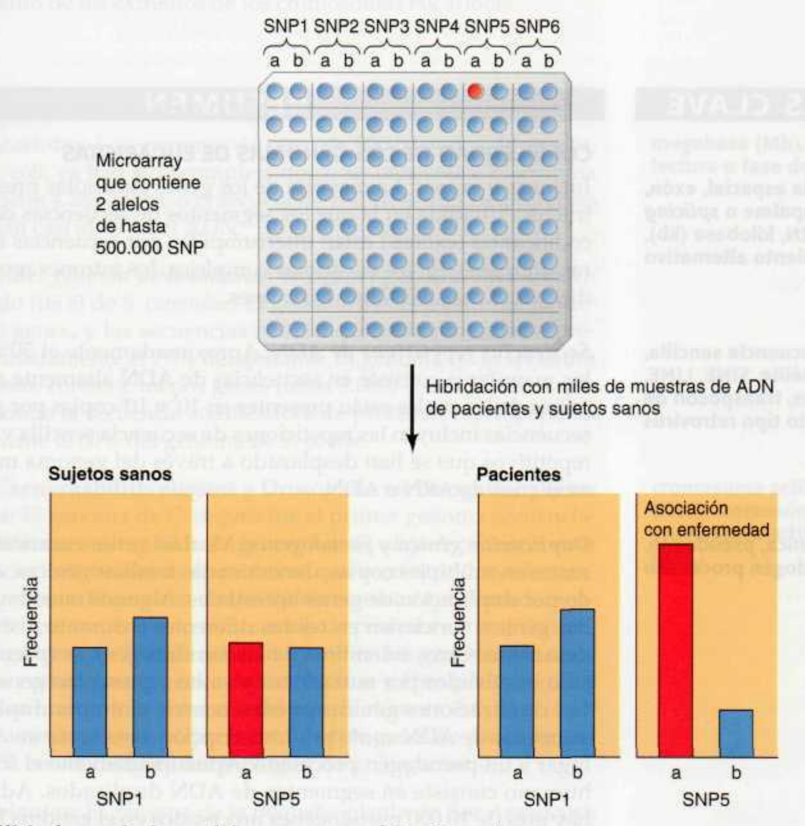


Figura 5.35 Análisis de asociaciones del genoma completo. Se analizan muestras de ADN de varios miles de pacientes y sujetos sanos mediante hibridación con *microarrays* que contienen ambos alelos (designados como *a* y *b*) de hasta 500.000 SNP comunes (designados como SNP1, SNP2, etc.). En este ejemplo, el alelo *a* del SNP5 se vincula con susceptibilidad a la enfermedad (rojo). Las muestras de ADN de los pacientes y los controles se hibridan a unas frecuencias similares con ambos alelos de otros SNP (como SNP1) y las muestras de ADN de los sujetos sanos se hibridan a unas frecuencias similares con ambos alelos del SNP5. Por el contrario, las muestras de ADN de los pacientes se hibridan más a menudo con el alelo *a* del SNP5, lo que refleja su asociación con la enfermedad. (Modificado de A. M. Bowcok, 2007. *Nature* 447:645.)

que confiere susceptibilidad a una enfermedad y un SNP determinado, el alelo de este SNP aparecerá más a menudo en el ADN de los pacientes que en el de los sujetos sanos. Se conoce la posición del SNP, de modo que estos resultados reflejan la existencia de una asociación de una región específica del genoma y, por consiguiente, de un gen, con un mayor riesgo de dicho trastorno. Los resultados de estos análisis de asociaciones del genoma completo no solamente permitirán establecer una asociación entre genes específicos con la susceptibilidad a distintas entidades, sino que facilitarán la adaptación de abordajes de prevención y tratamiento de enfermedades por parte de los médicos con arreglo al trasfondo genético de sus pacientes. Las comparaciones entre los genomas de otros grupos de sujetos pueden también ayudar a conocer la contribución de nuestros genes a otras características exclusivas, como la habilidad atlética o la inteligencia, así como a comprender mejor las interacciones genético-ambientales que determinan comportamientos humanos complejos.

PALABRAS CLAVE

RESUMEN

COMPLEJIDAD DE LOS GENOMAS DE EUCARIOTAS

gen, secuencia espacial, exón, intrón, empalme o *splicing* del ARN, kilobase (kb), procesamiento alternativo

Intrones y exones: La mayoría de los genes eucariotas presentan una estructura dividida en la que los segmentos de secuencias codificadoras o codificantes (exones) están interrumpidas por secuencias no codificadoras (intrones). En los eucariotas complejos, los intrones representan unas diez veces más ADN que los exones.

repetición de secuencia sencilla, ADN satélite, SINE, LINE, retrotransposones, transposón de ADN, elemento tipo retrovirus

Secuencias repetitivas de ADN: Aproximadamente el 50% del ADN de los mamíferos consiste en secuencias de ADN altamente repetitivas, algunas de las cuales están presentes en 10^5 y 10^6 copias por genoma. Estas secuencias incluyen las repeticiones de secuencia sencilla y los elementos repetitivos que se han desplazado a través del genoma mediante intermediarios de ARN o ADN.

familia génica, pseudogén, pseudogén procesado

Duplicación génica y pseudogenes: Muchos genes eucarióticos están presentes en múltiples copias, denominadas familias génicas, que han surgido por duplicación de genes ancestrales. Algunos miembros de las familias génicas funcionan en tejidos diferentes o durante distintas fases del desarrollo. Otros miembros de las familias génicas (pseudogenes) han sido inactivados por mutaciones y ya no representan genes funcionales. Las duplicaciones génicas pueden ocurrir tanto por duplicación de un segmento de ADN como por transcripción inversa de un ARNm, dando lugar a un pseudogén procesado. Aproximadamente el 5% del genoma humano consiste en segmentos de ADN duplicados. Adicionalmente, hay más de 10.000 pseudogenes procesados en el genoma humano.

Composición de los genomas de los eucariotas superiores: Sólo una pequeña fracción del genoma en los eucariotas complejos corresponde a secuencias codificadoras de proteína. El genoma humano se estima que contiene 20.000-25.000 genes, donde la secuencia codificadora de proteína corresponde solamente al 1,2% del ADN. Aproximadamente el 20% del genoma humano consiste en intrones, y más del 60% está compuesto por secuencias de ADN repetitivas y duplicadas.

RESUMEN

CROMOSOMAS Y CROMATINA

Cromatina: El ADN de las células eucariotas se encuentra envuelto por histonas que forman nucleosomas. La cromatina se puede compactar aún más mediante el plegamiento de los nucleosomas en estructuras altamente ordenadas, incluyendo la condensación de los cromosomas en metafase de las células entrando en mitosis.

Centrómeros: Los centrómeros son regiones especializadas de los cromosomas eucariotas que sirven como sitios en las que las cromátidas hermanas se unen y los puntos de unión de las fibras del huso durante la mitosis. La función centromérica depende de una variante histónica semejante a H3 que se mantiene por un mecanismo epigenético durante la división celular.

Telómeros: Los telómeros son secuencias especializadas necesarias para el mantenimiento de los extremos de los cromosomas eucariotas.

SECUENCIAS DE LOS GENOMAS COMPLETOS

Genomas procariotas: Los genomas de cerca de 500 bacterias diferentes, incluyendo *E. coli*, ya han sido completamente secuenciadas. El genoma de *E. coli* contiene 4.288 genes, con secuencias codificadoras de proteínas que representan casi el 90% del ADN.

Secuenciación del genoma de levaduras: El primer genoma eucariota en ser secuenciado fue el de *S. cerevisiae*. El genoma de las levaduras contiene unos 6.000 genes, y las secuencias codificadoras de proteínas representan aproximadamente el 70% del genoma. El genoma de la levadura de fisión *S. pombe* contiene menos genes (unos 5.000) y más intrones que *S. cerevisiae*, donde la secuencia codificadora de proteínas corresponde a aproximadamente el 60% del genoma de *S. pombe*.

Genomas de **Caenorhabditis elegans** *y* **Drosophila melanogaster y otros invertebrados:** El genoma de *C. elegans* fue el primer genoma secuenciado de un organismo multicelular. El genoma de *C. elegans* contiene unas 19.000 secuencias codificadoras de proteína, que corresponden solamente al 25% del genoma. El genoma de *Drosophila* contiene aproximadamente 14.000 genes, con secuencias codificadoras de proteína correspondiendo al 13% del genoma. Se han secuenciado también los genomas de otros invertebrados, como otras especies de nematodos y *Drosophila*, algunos insectos, el erizo marino y la anémona del mar. El número de genes identificado en estas especies indica que la cantidad de genes no presenta una relación directa con la complejidad biológica de un organismo.

Genomas de plantas: El genoma de la pequeña planta de flor *Arabidopsis thaliana* contiene unos 26.000 genes, lo que sorprende al ser una cifra más alta que las descritas en *Drosophila* o *C. elegans*. Muchos de estos genes aparecen solamente en el reino vegetal, como los que intervienen en la fisiología, el desarrollo y la defensa de las plantas. Se han secuenciado, además, los genomas del arroz y del álamo negro, que parecen incluir más de 40.000 genes. El gran número de genes que contienen estas especies reflejaría, en parte, la duplicación de grandes regiones de sus genomas.

PALABRAS CLAVE

cromatina, histona, nucleosoma, partícula central del nucleosoma, cromatosoma, eucromatina, heterocromatina

centrómero, cinetocoro H3 centromérica (CenH3), CENP-A, herencia epigenética

telómero, telomerasa

megabase (Mb), marco abierto de lectura o fase de lectura abierta

cromosoma artificial de levaduras (YAC), cromosoma politénico, cromosoma artificial bacteriano (BAC)

PALABRAS CLAVE

hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

bioinformática, biología de sistemas

análisis de asociaciones del genoma completo

RESUMEN

El genoma humano: El genoma humano parece contener 20.000-25.000 genes —sólo el doble del número de genes encontrados en animales más sencillos como *Drosophila* o *C. elegans*—. Más del 40% de las proteínas humanas predichas están relacionadas con proteínas que se encuentran en otros organismos secuenciados, incluyendo a *Drosophila* y *C. elegans*. Adicionalmente, el genoma humano contiene números expandidos de genes implicados en el sistema nervioso, el sistema inmune, la coagulación sanguínea, el desarrollo, la señalización celular y la regulación de la expresión génica

Los genomas de otros vertebrados: Los genomas de peces, pollos, ratones, ratas, perros y monos rhesus proporcionan comparaciones importantes para el genoma humano. Todos estos vertebrados contienen números similares de genes pero en muchos casos difieren sustancialmente en su contenido de secuencias repetidas.

BIOINFORMÁTICA Y BIOLOGÍA DE SISTEMAS

Análisis sistemático de la función génica: Los proyectos de secuenciación genómica han introducido técnicas de experimentación a gran escala e informáticos a la investigación en biología celular y molecular. Los análisis de genoma completo que emplean la interferencia de ARN pueden identificar sistemáticamente todos los genes de un organismo que están implicados en cualquier proceso biológico que puede ensayarse en un formato de alto rendimiento.

Regulación de la expresión génica: La identificación de secuencias reguladoras génicas y la dilucidación de las redes de señalización que controlan la expresión génica son grandes retos para la bioinformática y la biología de sistemas. Los problemas se están enfocando mediante estudios en genomas completos de la expresión génica, combinada con el desarrollo de técnicas informáticas para identificar los elementos reguladores funcionales.

La variación entre individuos y la medicina genómica: Las variaciones entre nuestros genomas son responsables de las características de las personas individuales, incluyendo la susceptibilidad a diversas patologías. Se están aplicando análisis de asociaciones del genoma completo para identificar genes vinculados con la susceptibilidad a diversas enfermedades frecuentes. La identificación de estos determinantes genéticos permitirá, en última instancia, plantear nuevas estrategias de prevención y tratamiento de enfermedades adaptadas al trasfondo genético de cada sujeto.

Preguntas

1. Muchos organismos poseen tamaños de genoma que son mucho mayores de lo que su complejidad parece requerir. Explica esta paradoja.

2. ¿Cómo se descubrieron los intrones durante los estudios de ARNm de adenovirus?

3. ¿Cómo incrementan las secuencias intrónicas del genoma humano la diversidad de proteínas expresadas a partir de limitado número de 20.000-25.000 genes?

4. ¿Cómo puede separarse el ADN repetitivo de secuencia sencilla del resto del ADN nuclear?

5. Los centrómeros de levadura (*S. cerevisiae*) forman un cinetócoro que se une a un solo microtúbulo, mientras que en la mayoría de células animales múltiples microtúbulos están unidos a cinetócoros. ¿Cómo refleja esta diferencia la estructura de los centrómeros de *S. cerevisiae*?

6. Cuando se introduce una secuencia centromérica en un plásmido circular y se inserta en levaduras, sus genes se reproducen y segregan con normalidad en cada división celular; pero cuando se corta en un punto con una endonucleasa de restricción para crear un cromosoma lineal, los genes plasmídicos se pierden

rápidamente por parte de las levaduras. Explícalo. ¿Qué experimento adicional realizarías para confirmar tu explicación hipotética?

7. ¿Cuál es la distancia media entre genes en el genoma humano?

8. Aproximadamente ¿cuántas moléculas de histona H1 están unidas al ADN genómico de levaduras?

9. ¿Cuál es la longitud media de un intrón en un gen humano?

10. Has construido una biblioteca en un vector plasmídico que contiene ADNc completos. ¿Cuál es el tamaño medio esperado de un inserto?

11. ¿En qué se diferenciaba la técnica empleada por Celera Genomics para secuenciar el genoma humano de la empleada por el Consorcio Internacional de Secuenciación del Genoma Humano?

12. ¿Por qué es más difícil identificar las secuencias reguladoras que las secuencias codificadoras de proteínas? ¿Cuáles son las diferentes técnicas empleadas para identificar las secuencias reguladoras funcionales?

13. ¿Qué es un SNP? ¿Qué resultados se espera obtener del estudio de SNP?

Bibliografía

Complejidad de los genomas eucariotas

Ben-Dov, C., B. Hartmann, J. Lundgren and J. Valcarel. 2008. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 283: 1229–1233. [R]

Berget, S. M., C. Moore and P. A. Sharp. 1977. Spliced segments at the 5′ terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3171–3175. [P]

Blencowe, B. J. 2006. Alternative splicing: new insights from global analysis. *Cell* 126: 37–47. [R]

Britten, R. J. and D. E. Kohne. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529–540. [P]

Chow, L. T., R. E. Gelinas, T. R. Broker and R. J. Roberts. 1977. An amazing sequence arrangement at the 5′ ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12: 1–8. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–945. [P]

Jeffares, D. C., T. Mourier and D. Penny. 2006. The biology of intron gain and loss. *Trends Genet.* 22: 16–22. [R]

Kazazian, H. H., Jr. 2004. Mobile elements: Drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626–1632. [R]

Maniatis, T. and B. Tasic. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418: 236–243. [R]

Roy, S. W. and W. Gilbert. 2006. The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress. *Nature Rev. Genet.* 7: 211–221. [R]

Schmidt, E. E. and C. J. Davies. 2007. The origins of polypeptide domains. *BioEssays* 29: 262–270. [R]

Tilghman, S. M., P. J. Curtis, D. C. Tiemeier, P. Leder and C. Weissmann. 1978. The intervening sequence of a mouse β-globin gene is transcribed within the 15S β-globin mRNA precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1309–1313. [P]

Venter, J. C. and 273 others. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304–1351. [P]

Zhang, Z. and M. Gerstein. 2004. Large-scale analysis of pseudogenes in the human genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 328–335. [R]

Cromosomas y cromatina

Black, B. E. and E. A. Bassett. 2008. The histone variant CENP-A and centromere specification. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 91–100 [R]

Blackburn, E. H. 2005. Telomeres and telomerase: Their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Letters* 579: 859–862. [R]

Blasco, M. A. 2007. Telomere length, stem cells and aging. *Nature Chem. Biol.* 3: 640–649. [R]

Ferreira, M. G., K. M. Miller and J. P. Cooper 2004. Indecent exposure: When telomeres become uncapped. *Mol. Cell* 13: 7–18. [R]

Gilson, E. and V. Geli. 2007. How telomeres are replicated. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 825–838. [R]

Henikoff, S. and Y. Dalal. 2005. Centromeric chromatin: What makes it unique? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15: 177–184. [R]

Kornberg, R. D. 1974. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868–871. [P]

Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251–260. [P]

Morris, C. A. and D. Moazed. 2007. Centromere assembly and propagation. *Cell* 128: 647–650. [R]

Paulson, J. R. and U. K. Laemmli. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12: 817–828. [P]

Schueler, M. G., A. W. Higgins, M. Katharine Rudd, K. Gustashaw and H. F. Willard. 2001. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294: 109–115. [P]

Sun, X., J. Wahlstrom and G. Karpen. 1997. Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. *Cell* 91: 1007–1019. [P]

Tremethick, D. J. 2007. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell* 128: 651–654. [R]

Van Holde, K. and J. Zlatanova. 2007. Chromatin fiber structure: where is the problem now? *Sem. Cell Dev. Biol.* 18: 651–658. [R]

Verdun, R. E. and J. Karlseder. 2007. Replication and protection of telomeres. *Nature* 447: 924–931. [R]

Woodcock, C. L. 2006. Chromatin architecture. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 16: 213–220. [R]

Secuencias de los genomas completos

Adams, M. D. and 194 others. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185–2195. [P]

Andersson, S. G. E., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. M. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A.-S. Eriksson, H. H. Winkler and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133–140. [P]

Aparicio, S. and 40 others. 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297: 1301–1310. [P]

Ashburner, M. and C. M. Bergman. 2005. *Drosophila melanogaster*: a case study of a model genomic sequence and its consequences. *Genome Res.* 15: 1661–1667. [R]

Baltimore, D. 2001. Our genome unveiled. *Nature* 409: 814–816. [R]

Blattner, F. R. and 16 others. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1462. [P]

Bult, C. J. and 39 others. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058–1073. [P]

Chervitz, S. A., L. Aravind, G. Sherlock, C. A. Ball, E. V. Koonin, S. S. Dwight, M. A. Harris, K. Dolinski, S. Mohr, T. Smith, S. Weng, J. M. Cherry and D. Botstein. 1998. Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: Orthology and divergence. *Science* 282: 2022–2028. [R]

Fleischmann, R. D., and 39 others. 1995. Whole-genome random sequencing and

assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496–512. [P]

Goff, S. A. and 54 others. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Science* 296: 92–100. [P]

Goffeau, A. and 15 others. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546–567. [P]

Goldstein, D. B. and G. L. Cavalleri. 2005. Understanding human diversity. *Nature* 437: 1241–1242. [R]

Hillier, L. W., A. Coulson, J. I. Murray, Z. Bao, J. E. Sulston and R. H. Waterston. 2005. Genomics in *C. elegans*: So many genes, such a little worm. *Genome Res.* 15: 1651–1660. [R]

International Chicken Genome Sequencing Consortium. 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432: 695–715. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–945. [P]

International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436: 793–800. [P]

Karlsson, E. K. and 19 others. 2007. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nature Genet.* 39: 1321–1328. [P]

Kirkness, E. F., V. Bafna, A. L. Halpern, S. Levy, K. Remington, D. B. Rusch, A. L. Delcher, M. Pop, W. Wang, C. M. Fraser and J. C. Venter. 2003. The dog genome: Survey sequencing and comparative analysis. *Science* 301: 1898–1903. [P]

Lindblad-Toh, K. and 46 others. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438: 803–819. [P]

Martienssen, R. and W. R. McCombie. 2001. The first plant genome. *Cell* 105: 571–574. [R]

Mikkelsen, T. S. and 63 others. 2007. Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences. *Nature* 447: 167–178. [P]

Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002. Initial sequence and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520–562. [P]

Oliver, S. G. and 146 others. 1992. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature* 357: 38–46. [P]

Putnam, N. H. and 18 others. 2007. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* 317: 86–94. [P]

Rat Genome Sequencing Project Consortium. 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428: 493–521. [P]

Rhesus Macaque Genome Sequencing and Analysis Consortium. 2007. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science* 316: 222–234. [P]

Rubin, G. M. 2001. The draft sequences: Comparing species. *Nature* 409: 820–821. [R]

Scherens, B. and A. Goffeau. 2004. The uses of genome-wide yeast mutant collections. *Genome Biol.* 5: 229. [R]

Sea Urchin Genome Sequencing Consortium. 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314: 941–952. [P]

Sterck, L., S. Rombauts, K. Vandepoele, P. Rouze and Y. Van de Peer. 2007. How many genes are there in plants (... and why are they there)? *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 199–203. [R]

Sutter, N. B. and 20 others. 2007. A single *IGF1* allele is a major determinant of small size in dogs. *Science* 316: 112–115. [P]

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815. [P]

The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2018. [P]

The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. 2005. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* 437: 69–87. [P]

The Honeybee Genome Sequencing Consortium. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931–949. [P]

The International Chimpanzee Chromosome 22 Consortium. 2004. DNA sequence and comparative analysis of chimpanzee chromosome 22. *Nature* 429: 382–388. [P]

Tuskan, G. A. and 109 others. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596–1604. [P]

Venter, J. C. and 273 others. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304–1351. [P]

Walbot, V. 2000. A green chapter in the book of life. *Nature* 408: 794–795. [R]

Warren, W. C. and 105 others. 2008. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature* 453: 175–184. [P]

Wayne, R. K. and E. A. Ostrander. 2007. Lessons learned from the dog genome. *Trends Genet.* 23: 557–567. [R]

Wood, V. and 132 others. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415: 871–880. [P]

Yu, J. and 99 others. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica*). *Science* 296: 79–92. [P]

Bioinformática y biología de sistemas

Aldridge, B. B., J. M. Burke, D. A. Lauffenberger and P. K. Sorger. 2006. Physicochemical modeling of cell signaling pathways. *Nature Cell Biol.* 8: 1195–1203. [R]

Bowcock, A. M. 2007. Guilt by associati *Nature* 447: 645–646. [R]

Ehrenberg, M., J. Elf, E. Aurell, R. Sandb and J. Tegner. 2003. Systems biology is ta ing off. *Genome Res.* 13: 2377–2380. [R]

Elnitski, L., V. X. Jin, P. J. Farnham and S. J. M. Jones. 2006. Locating mammalian transcription factor binding sites: a survey of computational and experimental techniques. *Genome Res.* 16: 1455–1464. [R]

Friedman, A. and N. Perrimon. 2004. Genome-wide high-throughput screens functional genomics. *Curr. Opin. Gen Dev.* 14: 470–476. [R]

Ge, H., A. J. M. Walhout and M. Vidal. 20 Integrating 'omic' information: A brid between genomics and systems biolo *Trends Genet.* 19: 551–559. [R]

Harbison, C. T. and 19 others. 2004. Transcriptional regulatory code of a eukary genome. *Nature* 431: 99–104. [P]

Hinds, D. A., L. L. Stuve, G. B. Nilsen, E. Halperin, E. Eskin, D. G. Ballinger, K. Frazer and D. R. Cox. 2005. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Sci* 307: 1072–1079. [P]

Holt, R. A. and S. J. M. Jones. 2008. The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome Res.* 18: 839–846. [R]

Kirschner, M. W. 2005. The meaning of systems biology. *Cell* 121: 503–504. [R]

Kitano, H. 2002. Systems biology: A br overview. *Science* 295: 1662–1664. [R]

Komili, S. and P. Silver. 2008. Coupling and coordination in gene expression proce a systems biology view. *Nature Rev. Gen* 9: 38–48. [R]

Levy, S. and 30 others. 2007. The dip genome sequence of an individual hu *PLoS Biology* 5:e254. [P]

Mathew, C. G. 2008. New links to the pat genesis of Crohn disease provided genome-wide association scans. *Nat Rev. Genet.* 9: 9–14. [R]

McCarthy, M. I., G. R. Abecasis, L. R. Ca D. B. Goldstein, J. Little, J. P. A. Ioa and J. N. Hirschhorn. 2008. Genome-w association studies for complex traits: con sensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev. Genet.* 9: 356–369. [R]

Wasserman, W. W. and A. Sandelin. 2004. Ap plied bioinformatics for the identific of regulatory elements. *Nature Rev. Gen* 5: 276–287. [R]

Wheeler, D. A. and 26 others. 2008. The com plete genome of an individual by mass ly parallel DNA sequencing. *Natu* 872–877. [P]

Xie, X., J. Lu, E. J. Kulbokas, T. R. Gol Mootha, K. Lindblad-Toh, E. S. La and M. Kellis. 2005. Systematic disc of regulatory motifs in human pro and 3′ UTRs by comparison of sev mammals. *Nature* 434: 338–345. [P]

Zhu, X., M. Gerstein and M. Snyder. Getting connected: analysis and prin of biological networks. *Genes De* 1010–1024. [R]

CAPÍTULO 6

Replicación, mantenimiento y reorganización del ADN genómico

EL PROCESO BIOLÓGICO FUNDAMENTAL DE LA REPRODUCCIÓN requiere la transmisión fiel de la información genética de padres a hijos. Por tanto, resulta esencial la replicación exacta del ADN genómico para la vida de todas las células y organismos. Cada vez que una célula se divide, su genoma completo debe duplicarse, necesitándose una compleja maquinaria para copiar las grandes moléculas de ADN que componen los cromosomas procariotas y eucariotas. Además, las células han desarrollado mecanismos para corregir los fallos que algunas veces se cometen durante la replicación del ADN y para reparar los daños que puedan surgir por la acción de agentes ambientales, como la radiación. Las anormalidades de estos procesos dan como resultado una replicación y un mantenimiento fallido del ADN genómico —un fallo que puede causar consecuencias desastrosas, como el desarrollo de un cáncer.

A pesar de la importancia de la replicación exacta y el mantenimiento del ADN, los genomas celulares no son estáticos. Para que las especies evolucionen, son necesarias mutaciones y reorganizaciones para mantener la variación genética entre los individuos. La recombinación entre cromosomas homólogos durante la meiosis desempeña un importante papel en este proceso puesto que permite a los genes parentales reorganizarse en nuevas combinaciones en la siguiente generación. Las reorganizaciones de las secuencias de ADN dentro del genoma se cree que también contribuyen a la evolución mediante la creación de nuevas combinaciones de información genética. Además, algunas reorganizaciones del ADN están programados para regular la expresión génica durante la diferenciación y el desarrollo de células individuales y organismos. En humanos, un ejemplo destacado es la reorganización de los genes de anticuerpos durante el desarrollo del sistema inmunológico. Un cuidadoso equilibrio entre el mantenimiento y la variación de la información genética resulta por tanto crítico tanto para el desarrollo de los organismos individuales como para la evolución de las especies.

Replicación del ADN

Tal y como explicamos en el Capítulo 4, la replicación del ADN es un proceso semiconservativo en el que cada hebra parental sirve como molde para la síntesis de una nueva hebra hija complementaria. La enzima principal implicada es la ADN polimerasa, que cataliza la unión de los desoxirribonu-

cleósidos 5′-trifosfato (dNTP) para formar la cadena de ADN en crecimiento. Sin embargo, la replicación del ADN es mucho más compleja que una reacción enzimática. Están involucradas otras proteínas, y son necesarios mecanismos de lectura para asegurar que la exactitud de la replicación es compatible con la baja frecuencia de errores que se permiten en la reproducción celular. También son necesarias proteínas adicionales y secuencias de ADN para iniciar la replicación y para copiar los extremos de los cromosomas eucariotas.

ADN polimerasas

La **ADN polimerasa** se identificó por primera vez en lisados de *E. coli* por Arthur Kornberg en 1956. La capacidad de esta enzima para copiar exactamente una hebra molde de ADN proporciona una base bioquímica para el modelo de replicación del ADN que inicialmente propusieron Watson y Crick, por lo que su aislamiento representó un descubrimiento importante en la biología molecular. Irónicamente, sin embargo, esta primera ADN polimerasa identificada (ahora llamada ADN polimerasa I) no es la enzima principal responsable de la replicación en *E. coli*. En su lugar, ahora está claro que tanto las células procariotas como eucariotas contienen diferentes *ADN polimerasas con funciones distintas en la replicación y reparación del* ADN. En células procariotas, la ADN polimerasa III es la principal polimerasa responsable de la replicación del ADN. Las células eucariotas contienen tres ADN polimerasas (α, δ y ε) que funcionan en la replicación del ADN nuclear. Una ADN polimerasa diferente (γ) se localiza en las mitocondrias y es responsable de la replicación del ADN mitocondrial.

Todas las ADN polimerasas conocidas comparten dos propiedades fundamentales que poseen implicaciones críticas para la replicación del ADN (Fig. 6.1). En primer lugar, todas las polimerasas sintetizan ADN sólo en la dirección 5′ a 3′, añadiendo un dNTP al grupo 3′ hidroxilo de una cadena creciente. En segundo lugar, las ADN polimerasas pueden añadir un nuevo deoxirribonucleótido sólo a una hebra cebadora ya existente que se encuentra unida mediante puentes de hidrógeno a una hebra molde; no son capaces de iniciar la síntesis de ADN de novo mediante la catálisis de la polimerización de dNTP libres. En este sentido, las ADN polimerasas difieren de las ARN polimerasas, que pueden iniciar la síntesis de una nueva hebra de ARN en ausencia de un cebador. Como se analizará más adelante en este capítulo, estas propiedades de las ADN polimerasas parecen ser críticas para el mantenimiento de la alta fidelidad de la replicación del ADN que es necesaria para la reproducción celular.

Horquilla de replicación

Las moléculas de ADN en proceso de replicación se analizaron por primera vez por John Cairns en experimentos en los que *E. coli* se cultivó en presencia de timidina radiactiva, lo que permitió la visualización por autorradiografía del nuevo ADN replicado (Fig. 6.2). En algunos casos, se pueden observar moléculas circulares completas en proceso de replicación. Estas moléculas de ADN contienen dos **horquillas de replicación**, que representan las regiones de la síntesis activa de ADN. En cada horquilla las hebras parentales se separan y son sintetizadas dos nuevas hebras hijas.

La síntesis de dos nuevas hebras de ADN complementarias a las dos hebras de la molécula parental trajo consigo un problema importante para entender la bioquímica de la replicación del ADN. Puesto que las dos hebras de la doble hélice de ADN se disponen en direcciones opuestas (antiparalelas), la síntesis continua de dos nuevas hebras en la horquilla de replicación requeriría que una de las hebras se sintetizara en sentido 5′ a 3′ mientras que la otra se sintetizaría en el sentido opuesto (3′ a 5′). Pero la ADN poli-

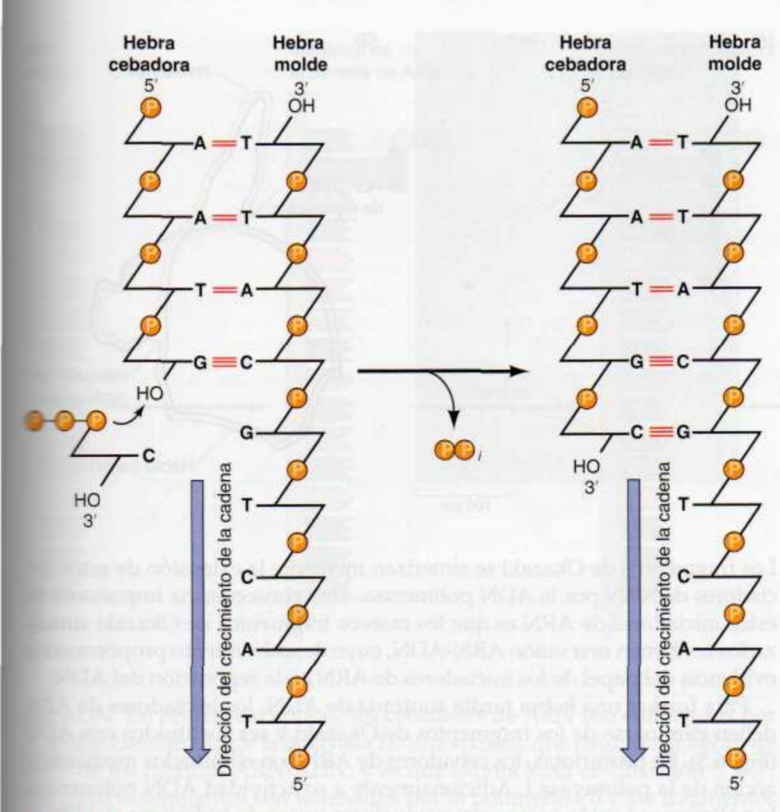


Figura 6.1 Reacción catalizada por la ADN polimerasa. Todas las ADN polimerasas conocidas añaden un desoxirribonucleósido 5′-trifosfato al grupo 3′ hidroxilo de una cadena de ADN creciente (la hebra cebadora).

merasa cataliza la polimerización de los dNTP solamente en sentido 5′ a 3′. Entonces, ¿cómo puede ser sintetizada la otra hebra de ADN?

El enigma se resolvió mediante experimentos que mostraban que sólo una hebra de ADN se sintetiza de manera continua en la dirección de la replicación del ADN; la otra se forma a partir de pequeñas piezas (1-3 kb) discontinuas de ADN que se sintetizan al revés con respecto al movimiento de la horquilla de replicación (Fig. 6.3). Estas pequeñas piezas del nuevo ADN sintetizado (denominados **fragmentos de Okazaki** en honor a su descubridor, el bioquímico japonés Reiji Okazaki) se unen por la acción de la **ADN ligasa**, formando una nueva hebra intacta de ADN. La hebra sintetizada de forma continua se denomina **hebra conductora**, debido a que su elongación en el sentido del movimiento de la horquilla de replicación expone el molde que se utilizará para la síntesis de los fragmentos de Okazaki (**hebra tardía**).

Aunque el descubrimiento de la síntesis discontinua de la hebra rezagada proporciona un mecanismo para la elongación de ambas hebras de ADN en la horquilla de replicación, surgió otra pregunta: puesto que las ADN polimerasas necesitan un cebador y no son capaces de iniciar la síntesis *de novo*, ¿cómo se inicia la síntesis de los fragmentos de Okazaki? La respuesta son los fragmentos cortos de ARN que sirven como iniciadores para la replicación del ADN (Fig. 6.4). Al contrario que la síntesis de ADN, la síntesis de ARN es capaz de iniciarse *de novo*, y una enzima llamada **primasa** sintetiza los fragmentos cortos de ARN (p. ej., de tres a diez nucleótidos de longitud) complementarios a la hebra rezagada molde en la horquilla de replicación.

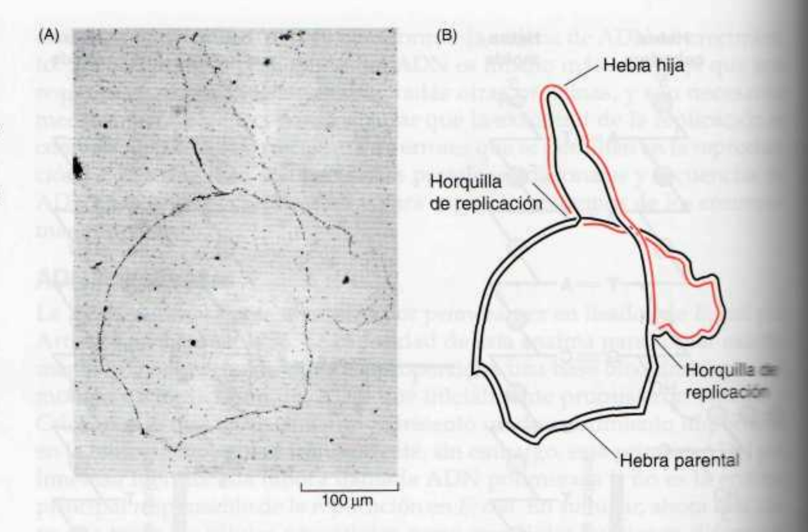


Figura 6.2 Replicación del ADN de *E. coli*. (A) Una autorradiografía mostrando las bacterias que crecieron en [³H]timidina durante dos generaciones para marcar el ADN, que se extrajo después para visualizarlo mediante una cinta fotográfica. (B) Este esquema ilustra las dos horquillas de replicación vistas en (A). (De J. Cairns, 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:43.)

Los fragmentos de Okazaki se sintetizan mediante la extensión de estos iniciadores de ARN por la ADN polimerasa. Una consecuencia importante de estos iniciadores de ARN es que los nuevos fragmentos de Okazaki sintetizados contienen una unión ARN-ADN, cuyo descubrimiento proporcionó la evidencia del papel de los iniciadores de ARN en la replicación del ADN.

Para formar una hebra tardía continua de ADN, los iniciadores de ARN deben eliminarse de los fragmentos de Okazaki y ser sustituidos con ADN (Fig. 6.5). En procariotas, los cebadores de ARN son eliminados mediante la acción de la polimerasa I. Adicionalmente a su actividad ADN polimerasa, la polimerasa I actúa como una exonucleasa capaz de hidrolizar el ADN (o ARN) tanto en la dirección 3′ a 5′ como en la 5′ a 3′. La acción de la polimerasa I como exonucleasa de 3′ a 5′ elimina ribonucleótidos de los extremos 5′ de los fragmentos de Okazaki, permitiendo su sustitución con desoxirribonucleótidos para dar lugar a fragmentos constituidos completamente

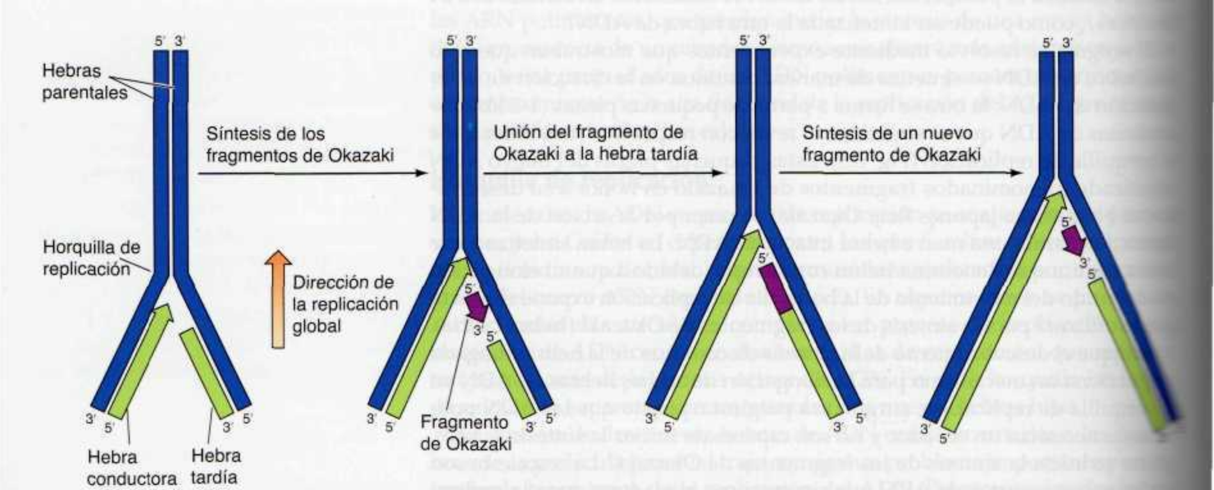


Figura 6.3 Síntesis de las hebras conductora y tardía de ADN. La hebra conductora se sintetiza de forma continua en la dirección del movimiento de la horquilla de replicación. La hebra tardía se sintetiza en pequeños fragmentos (fragmentos de Okazaki) en sentido opuesto al resto de la replicación. Los fragmentos de Okazaki se unen después mediante la acción de la ADN ligasa.

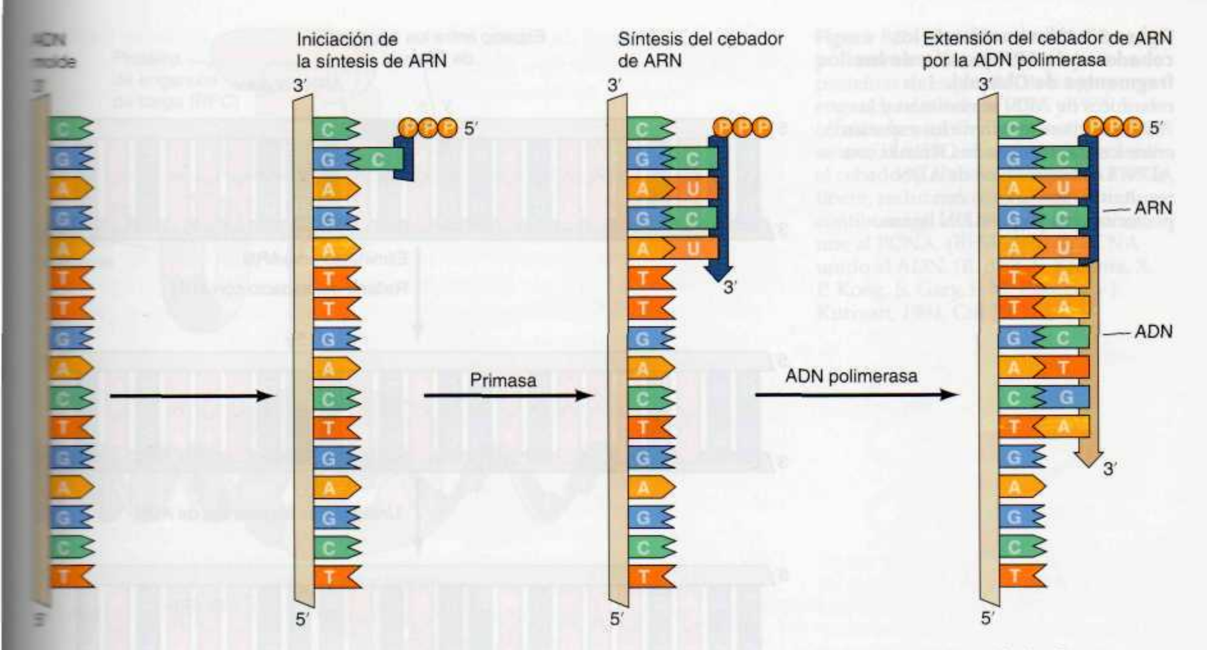


Figura 6.4 Origen de los fragmentos de Okazaki con cebadores de ARN. Fragmentos cortos de ARN sirven como iniciadores sobre los que puede actuar la ADN polimerasa.

por ADN. En células eucariotas, los cebadores de ARN son eliminados por la acción combinada de la **ARNasa H**, una enzima que degrada la hebra de ARN de los híbridos ARN-ADN, y es una exonucleasa en dirección 5′ a 3′. Los huecos resultantes son rellenados por la polimerasa δ y los fragmentos de ADN son unidos mediante la ADN ligasa, generando una hebra tardía intacta.

Como se indicó anteriormente, las diferentes ADN polimerasas juegan diferentes papeles en el horquilla de replicación tanto en células procariotas como eucariotas (Fig. 6.6). En *E. coli*, la polimerasa III es la principal polimerasa replicativa, funcionando en la síntesis tanto de la hebra conductora de ADN y de los fragmento s de Okazaki mediante la extensión de cebadores de ARN. En células eucariotas, tres ADN polimerasas distintas (α, δ y ε) están implicadas en la replicación del ADN nuclear. Los papeles de estas ADN polimerasas han sido estudiados en dos tipos de experimentos. En primer lugar, la replicación del ADN de algunos virus animales, como el SV40, puede estudiarse en extractos acelulares, permitiendo un análisis bioquímico directo de las actividades de las distintas ADN polimerasas además de otras proteínas implicadas en la replicación del ADN. En segundo lugar, las polimerasas α, δ y ε se encuentran en levaduras además de en células de mamífero, permitiendo el uso de las potentes técnicas de genética de levaduras (véase Cap. 4) para analizar sus papeles biológicos. El análisis bioquímico ha establecido que la polimerasa α se encuentra formando un complejo con la primasa, y funciona junto con la primasa para sintetizar fragmentos cortos de ARN-ADN durante la síntesis de la hebra tardía y en los orígenes de replicación (véase Fig. 6.12). A continuación, las polimerasas δ y ε actúan como las principales polimerasas en la replicación que se ocuparían de la síntesis de las hebras conductora y tardía, respectivamente.

No sólo las polimerasas y las primasas actúan en la horquilla de replicación sino que participan otras muchas proteínas. Estas proteínas adicionales se han identificado mediante el análisis de mutantes de *E. coli* y levaduras deficientes en la replicación del ADN y la purificación de proteínas de mamíferos necesarias para la replicación *in vitro* del ADN de SV40. Una clase

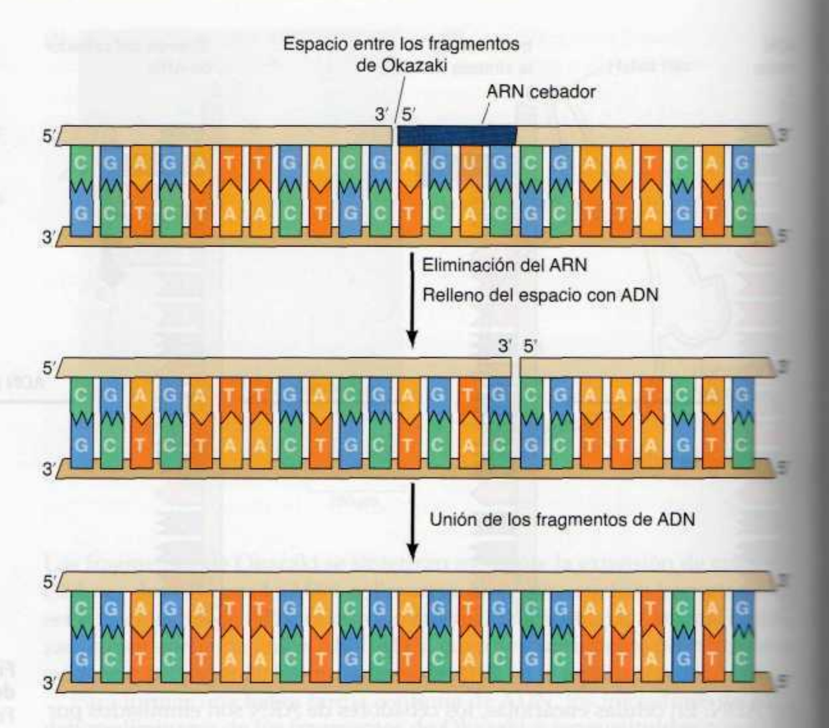


Figura 6.5 Eliminación de los cebadores de ARN y unión de los fragmentos de Okazaki. Los cebadores de ARN se eliminan y la ADN polimerasa rellena los espacios entre los fragmentos de Okazaki con ADN. Los fragmentos de ADN resultantes son unidos con posterioridad por la ADN ligasa.

de proteínas necesarias para la replicación se unen con las ADN polimerasas, aumentando la actividad de las polimerasas y manteniéndolas unidas al molde de ADN para que continúen la síntesis de la nueva hebra de ADN. Tanto la polimerasa III de *E. coli* como las polimerasas δ y ε de eucariotas están asociadas a proteínas de enganche deslizante (antígeno nuclear de células proliferativas [PCNA]) en eucariotas) que sitúan a la polimerasa en el cebador y mantienen su asociación estable con el molde (Fig. 6.7). Las proteínas de enganche de carga (factor de replicación C [RFC] en eucariotas) fijan a las proteínas de enganche deslizante al ADN en la zona de unión del cebador y el molde. Las proteínas de enganche de carga utilizan energía generada por hidrólisis del ATP para abrir los enganches deslizantes. A continuación, libera a la proteína de enganche deslizante, que forma un anillo en torno al ADN que actúa como molde. La proteína de enganche deslizante asocia a la ADN polimerasa con el ADN en el punto de intersección entre el cebador y el molde. El anillo formado por el enganche deslizante mantiene la asociación de la polimerasa con su molde conforme avanza la replicación.

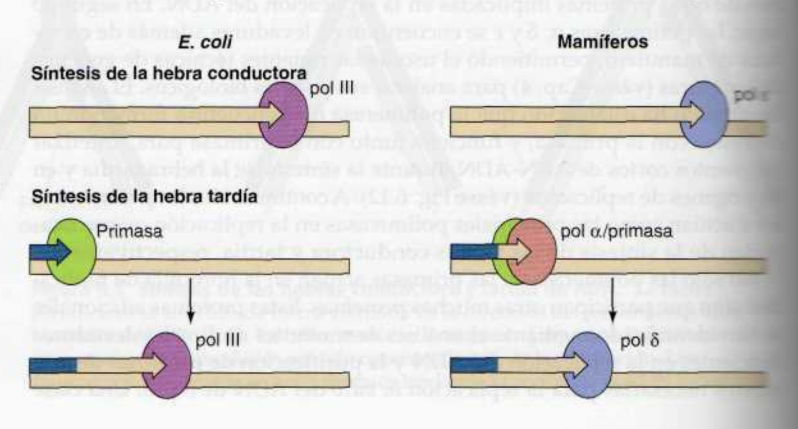
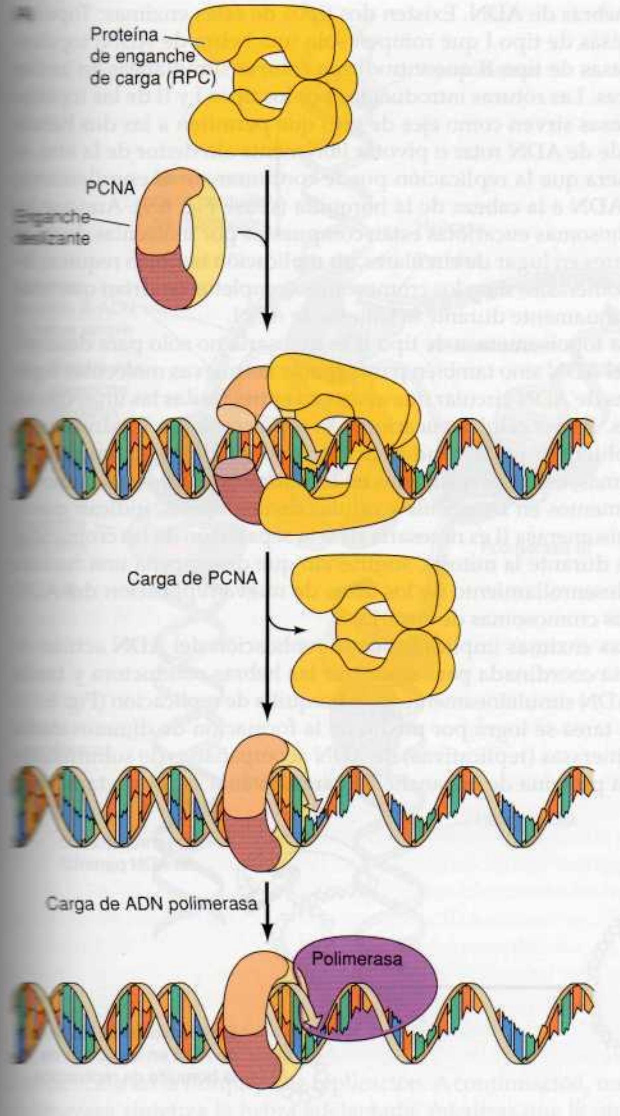


Figura 6.6 Papel de las ADN polimerasas en *E. coli.* y en células de mamíferos. La hebra conductora es sintetizada por las polimerasa III (pol III) en *E. coli* y por la polimerasa δ (pol δ) en las células de los mamíferos. En *E. coli*, una primasa inicia la síntesis de la hebra tardía, siendo leídos los iniciadores de ARN por la polimerasa III. En las células de los mamíferos, la síntesis de la hebra tardía la lleva a cabo un complejo de primasa y polimerasa α (pol α). Los fragmentos cortos de ARN-ADN sintetizados por el complejo son leídos por la polimerasa ε.



(B)

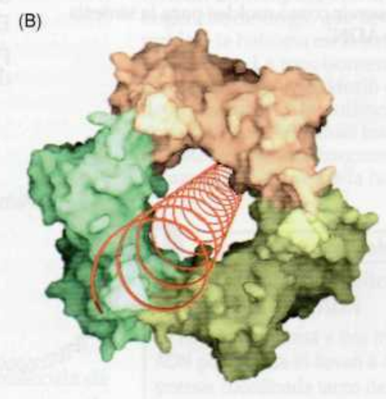


Figura 6.7 Proteínas accesorias a la polimerasa. (A) Un complejo de proteínas de enganche de carga y enganche deslizante (RFC y PCNA en células de mamífero, respectivamente) se une al ADN en la intersección entre el cebador y el molde. Entonces RFC se libera, reclutando PCNA al ADN. A continuación la ADN polimerasa se une al PCNA. (B) Modelo de PCNA unido al ADN. (B, de T. S. Krishna, X. P. Kong, S. Gary, P. M. Burgers y J. Kuriyan, 1994. *Cell* 79: 1233.)

que hace posible la síntesis ininterrumpida de miles de nucleótidos de ADN.

Otras proteínas desenrollan la hebra molde de ADN y estabilizan regiones de una sola hebra (Fig. 6.8). Las **helicasas** son enzimas que catalizan el desenrollamiento del ADN parental, emparejadas con la hidrólisis de ATP, a la cabeza de la horquilla de la replicación. **Proteínas de unión al ADN monocatenario** (p. ej., el factor de replicación A eucariota [RFA]) estabilizan la hebra molde de ADN desenrollada, manteniéndola en un estado de hebra única extendida para que sea copiada por la polimerasa.

A medida que las hebras parentales se desenrollan, el ADN a la cabeza de la horquilla de replicación está siendo forzado a girar. Sin restricciones, esta rotación causaría que las moléculas de ADN circular (como el ADN de SV40 o el cromosoma de *E. coli*) se enrollaran sobre sí mismas, bloqueando eventualmente la replicación (Fig. 6.9). Este problema lo resuelven las **topoisomerasas**, enzimas que catalizan la rotura reversible y la unión de

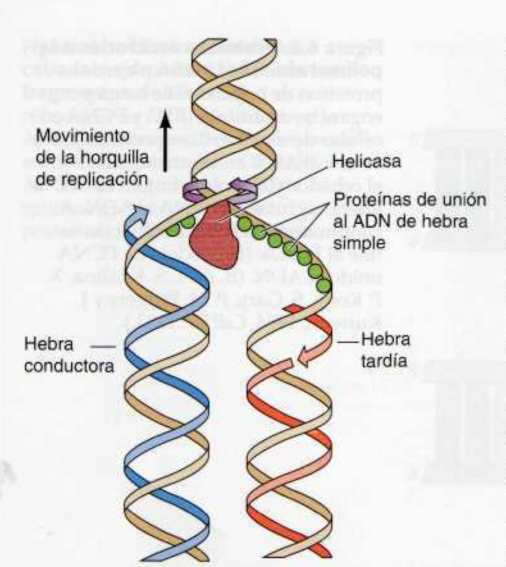


Figura 6.8 Acción de la helicasa y las proteínas de unión al ADN de hebra simple. Las helicasas desenrollan las dos hebras del ADN parentales situado en la cabeza de la horquilla de replicación. Las hebras de ADN desenrolladas son estabilizadas por las proteínas de unión al ADN de hebra simple de manera que puedan servir como moldes para la síntesis de un nuevo ADN.

las hebras de ADN. Existen dos tipos de estas enzimas: Topoisomerasas de tipo I que rompen solo una hebra de ADN; topoisomerasas de tipo II que introducen roturas simultáneas en ambas hebras. Las roturas introducidas por los tipos I y II de las topoisomerasas sirven como ejes de giro que permiten a las dos hebras molde de ADN rotar o pivotar libremente alrededor de la otra de manera que la replicación puede continuar sin el enrollamiento del ADN a la cabeza de la horquilla (véase Fig. 6.9). Aunque los cromosomas eucariotas están compuestos por moléculas de ADN lineares en lugar de circulares, su replicación también requiere topoisomerasas; si no los cromosomas completos tendrían que rotar continuamente durante la síntesis de ADN.

La topoisomerasa de tipo II es necesaria no solo para desenrollar el ADN sino también para separar las nuevas moléculas replicadas de ADN circular que aparecen entrelazadas las unas con las otras. En las células eucariotas, la topoisomerasa II parece estar involucrada en la condensación mitótica de los cromosomas. Además, estudios realizados en levaduras mutantes, así como experimentos en *Drosophila* y células de mamíferos, indican que la topoisomerasa II es necesaria para la separación de las cromátidas hijas durante la mitosis, sugiriendo que desempeña una función de desenrollamiento de los lazos de nueva replicación del ADN en los cromosomas de eucariotas.

Las enzimas implicadas en la replicación del ADN actúan de forma coordinada para sintetizar las hebras conductora y tardía de ADN simultáneamente en la horquilla de replicación (Fig. 6.10). Esta tarea se logra por medio de la formación de dímeros de las polimerasas (replicativas) de ADN acompañadas de subunidades de la proteína de enganche de carga, la cual se asocia también a

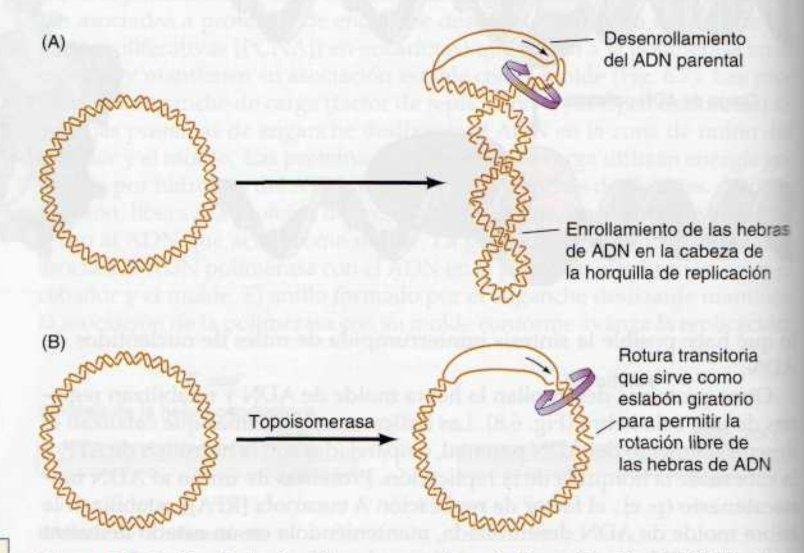


Figura 6.9 Acción de las topoisomerasas durante la replicación del ADN. (A) Una vez que las dos hebras de ADN están desenrolladas, el ADN que se encuentra en la cabeza de la horquilla de replicación es forzado a rotar en dirección opuesta, de forma que las moléculas circulares se enrollan sobre sí mismas. (B) Este problema lo resuelven las topoisomerasas, que catalizan la rotura y la unión reversibles de las hebras de ADN. Las roturas transitorias introducidas por estas enzimas actúan como eslabones giratorios que permiten a las dos hebras de ADN rotar libremente una sobre otra.

■ Un inhibidor de la topoisomerasa II, un principio activo denominado etopósido, se emplea como agente quimioterapéutico para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

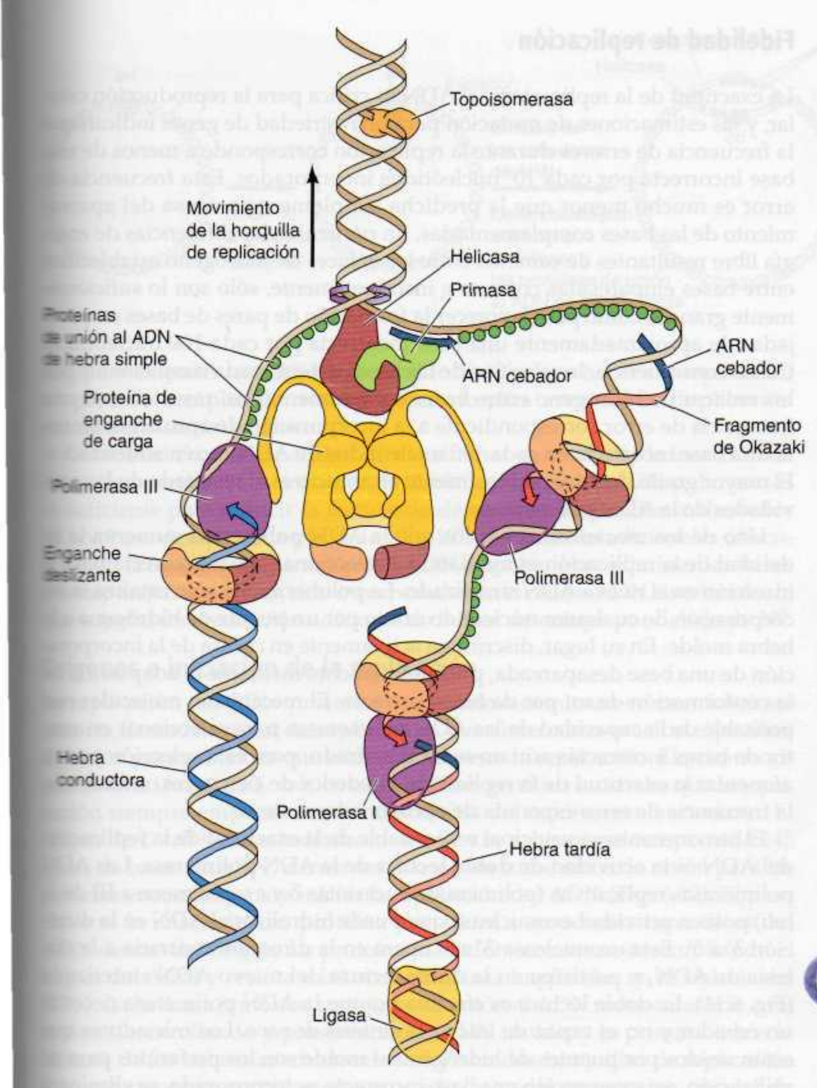


Figura 6.10 Modelo de la horquilla de replicación de *E. coli.* Una helicasa, una primasa y dos moléculas de ADN polimerasa III llevan a cabo la síntesis coordinada de las hebras conductora y tardía del ADN. Ambas moléculas de la polimerasa de ADN forman un complejo con la proteína de enganche de carga, que se encuentra unida a la helicasa en la horquilla de replicación. La topoisomerasa actúa como un eslabón giratorio en la cabeza de la horquilla, y la polimerasa I junto con una ligasa eliminan los cebadores de ARN y unen los fragmentos de Okazaki por detrás de la horquilla.

6.1 **Animación web**

Horquilla de replicación del ADN

La helicasa, primasa y dos moléculas de ADN polimerasa III llevan a cabo la síntesis coordinada tanto de la hebra conductora como de la tardía del ADN en la horquilla de replicación.

una helicasa en la horquilla de replicación. A continuación, una molécula de polimerasa sintetiza la hebra adelantada, mientras que la otra se ocupa de la síntesis de la hebra tardía. El molde de la hebra tardía se repliega en la horquilla de replicación de tal modo que la subunidad de la polimerasa encargada de su síntesis avanza en la misma dirección que la otra subunidad que fabrica la hebra conductora. La polimerasa que participa en la síntesis de la hebra tardía se separa de la hebra de ADN al llegar al final de un fragmento de Okazaki. Continúa asociada a la proteína de carga, por lo que se puede unir de nuevo con gran eficiencia a una nueva proteína de enganche de deslizamiento en la interesección del cebador y el molde para comenzar a sintetizar otro fragmento de Okazaki.

En las células eucariotas, los nucleosomas también son desorganizados durante la replicación del ADN. Los nucleosomas de la cromatina parental se dividen entre las dos hebras hijas de ADN, y nuevas histonas son añadidas para volver a ensamblar los nucleosomas por parte de proteínas adicionales (factores de ensamblaje de cromatina) que viajan junto con el horquilla de replicación.

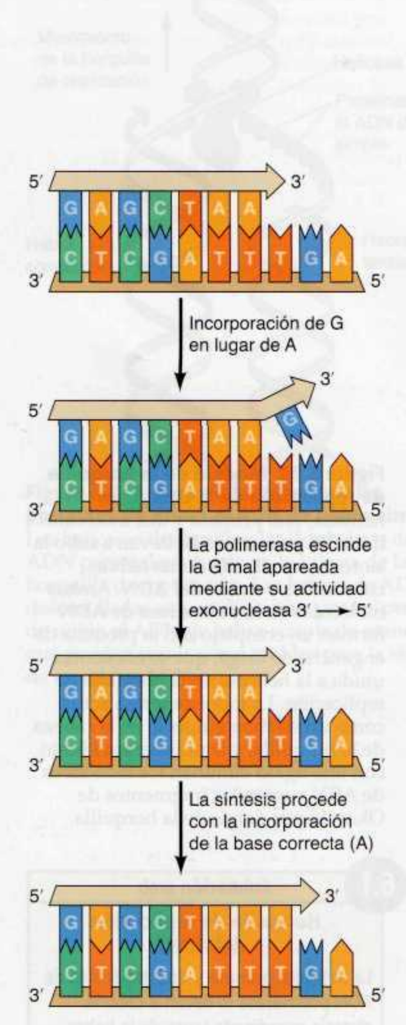


Figura 6.11 Doble lectura de la ADN polimerasa. Se incorpora G en lugar de A como resultado de un mal apareamiento con T en la hebra molde. Debido a este mal apareamiento, la G del extremo 3′ terminal no se une mediante enlaces de hidrógeno a la hebra molde. Este error de emparejamiento en el extremo 3′ de la cadena en crecimiento es reconocido y eliminado por la actividad exonucleasa 3′-5′ de la ADN polimerasa, quien necesita para continuar la síntesis un cebador unido por puentes de hidrógeno a la hebra molde. Tras la escisión de la G desapareada, la síntesis de ADN continúa con la incorporación del nucleótido correcto (A).

Fidelidad de replicación

La exactitud de la replicación del ADN es crítica para la reproducción celular, y las estimaciones de mutación para una variedad de genes indican que la frecuencia de errores durante la replicación corresponde a menos de una base incorrecta por cada 10^9 nucleótidos incorporados. Esta frecuencia de error es mucho menor que la predicha simplemente a causa del apareamiento de las bases complementarias. En particular, las diferencias de energía libre resultantes de cambios entre los enlaces de hidrógeno establecidos entre bases emparejadas correcta e incorrectamente, sólo son lo suficientemente grandes como para favorecer la formación de pares de bases emparejadas de aproximadamente una base incorrecta por cada 100 nucleótidos. Como consecuencia, la selección de las bases determinada simplemente por los enlaces de hidrógeno entre bases complementarias, resultaría en una frecuencia de error correspondiente a la incorporación de aproximadamente una base incorrecta en cada 100 nucleótidos de ADN recién sintetizados. El mayor grado de fidelidad realmente alcanzado es el resultado de las actividades de la ADN polimerasa.

Uno de los mecanismos por los que la ADN polimerasa aumenta la fidelidad de la replicación es ayudando a seleccionar la base correcta para la inserción en el nuevo ADN sintetizado. La polimerasa no solo cataliza la incorporación de cualquier nucleótido unido por un puente de hidrógeno a la hebra molde. En su lugar, discrimina activamente en contra de la incorporación de una base desapareada, presumiblemente mediante la adaptación de la conformación de un par de bases correcto. El mecanismo molecular responsable de la capacidad de las ADN polimerasas para seleccionar en contra de bases incorrectas aún no se ha descifrado, pero esta selección parece aumentar la exactitud de la replicación alrededor de cien veces, reduciendo la frecuencia de error esperada de aproximadamente 10^5.

El otro mecanismo principal responsable de la exactitud de la replicación del ADN es la actividad de **doble lectura** de la ADN polimerasa. Las ADN polimerasas replicativas (polimerasas eucariotas δ y ε y polimerasa III de *E. coli*) poseen actividad exonucleasa que puede hidrolizar el ADN en la dirección 3′ a 5′. Esta exonucleasa 3′ a 5′ opera en la dirección contraria a la síntesis de ADN, y participa en la doble lectura del nuevo ADN sintetizado (Fig. 6.11). La doble lectura es efectiva porque la ADN polimerasa necesita un cebador y no es capaz de iniciar la síntesis *de novo*. Los iniciadores que están unidos por puentes de hidrógeno al molde son los preferidos para su utilización, así que cuando una base incorrecta es incorporada, se elimina por la actividad de la exonucleasa 3′ a 5′ en lugar de continuar la síntesis. Las exonucleasas 3′ a 5′ de las ADN polimerasas replicativas escinden selectivamente las bases desapareadas que han sido incorporadas al final de una cadena de ADN en crecimiento, por lo que aumenta la exactitud de la replicación de cien a mil veces más.

La importancia de la doble lectura podría explicar el hecho de que las ADN polimerasas necesitan cebadores y que catalizan el crecimiento de las hebras de ADN solamente en el sentido 5′ a 3′. Cuando el ADN se sintetiza en el sentido 5′ a 3′, la energía necesaria para la polimerización se deriva de la hidrólisis del grupo 5′-trifosfato de un dNTP libre y es añadido al grupo 3′-hidroxilo de la cadena creciente (véase Fig. 6.1). Si el ADN se tuviera que extender en sentido 3′ a 5′, la energía de polimerización tendría que derivarse de la hidrólisis del grupo 5′-trifosfato del nucleótido terminal recién incorporado al ADN. Esto eliminaría la posibilidad de la doble lectura, debido a que la eliminación de un nucleótido terminal desapareado también eliminaría al grupo 5′-trifosfato necesario como fuente de energía para la elongación de la cadena. Por tanto, aunque la capacidad de la ADN polime-

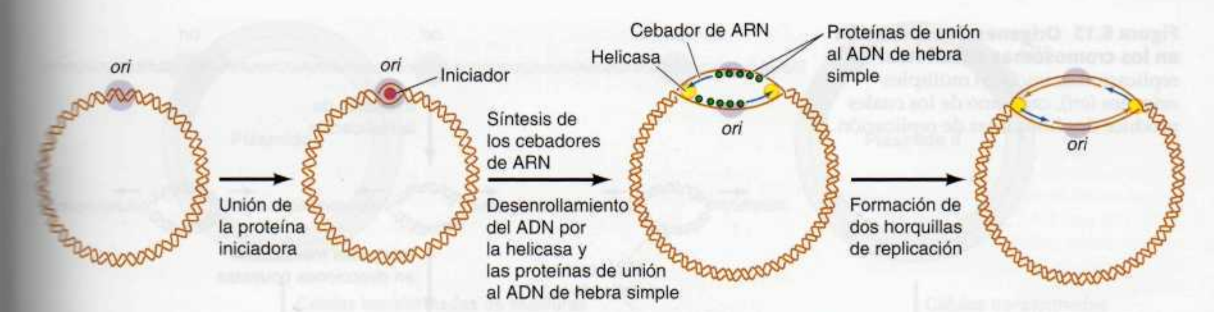


Figura 6.12 Origen de la replicación de *E. coli*. La replicación se inicia en un único sitio del cromosoma de *E. coli*, denominado origen (*ori*). El primer acontecimiento es la unión de una proteína iniciadora al ADN *ori*, que conduce el desenrollamiento parcial del molde. El ADN continúa desenrollándose debido a la acción de la helicasa y de las proteínas de unión al ADN de hebra simple, mientras que los cebadores son sintetizados por la primasa. Las dos horquillas de replicación formadas en el origen se mueven en direcciones opuestas a lo largo de la molécula de ADN circular.

tasa para extender un cebador en sentido 5′ a 3′parece hacer a la replicación un proceso complicado, resulta necesario para asegurar la duplicación exacta del material genético.

Combinada con la capacidad de discriminar en contra de la inserción de bases desapareadas, la actividad de doble lectura de las ADN polimerasas es suficiente para reducir la frecuencia de error de replicación a alrededor de una base desapareada por cada 10^7 a 10^8. Mecanismos adicionales (discutidos en la sección «Reparación del ADN») actúan para eliminar las bases desemparejadas que han sido incorporadas en el nuevo ADN sintetizado, lo que supone una reducción adicional de la tasa de errores por debajo de 10^9.

Orígenes e iniciación de la replicación

La replicación del ADN procariota y eucariota comienza en una única secuencia llamada **origen de replicación**, que sirve como un sitio específico de unión para proteínas que inician el proceso de replicación. El primer origen descrito fue el de *E. coli*, en cuyo análisis genético mostraba que la replicación siempre empezaba en un único sitio del cromosoma bacteriano. El origen de *E. coli* se ha estudiado en detalle y se sabe que se compone de 245 pares de bases de ADN, elementos que sirven como sitios de unión para las proteínas necesarias para iniciar la replicación del ADN (Fig. 6.12). El paso clave es la unión de una proteína iniciadora a secuencias específicas del ADN dentro del origen. La proteína iniciadora comienza desenrollando el origen del ADN y recluta a las otras proteínas implicadas en la síntesis del ADN. La helicasa junto con proteínas de unión al ADN monocatenario continúan desenrollando y presentando al ADN molde, y la primasa inicia la síntesis de las hebras conductoras. Se forman dos horquillas de replicación que se mueven en sentidos opuestos a lo largo del cromosoma circular de *E. coli*.

El origen de la replicación en los virus de animales, como el SV40, se ha estudiado como modelo para la iniciación de la síntesis en eucariotas. SV40 presenta un solo origen de replicación (consiste en 64 pares de bases) que funciona tanto en células infectadas como en sistemas libres de células. La replicación comienza por una proteína codificada por el virus (llamada antígeno T) que se une al origen y que actúa como helicasa. Se requiere una proteína de unión al ADN monocatenario para estabilizar a la hebra molde desenrollada, y un complejo ADN polimerasa α-primasa comienza entonces la síntesis de ADN.

Aunque resulta suficiente un solo origen para dirigir la replicación de genomas bacterianos y virales, se necesitan múltiples orígenes para replicar los genomas más largos de las células eucariotas en un período de tiempo razonable. Por ejemplo, el genoma completo de *E. coli* (4×10^6 pares de bases) se replica partiendo de un solo origen en unos 30 minutos. Si los genomas de mamíferos (3×10^9 pares de bases) se replicaran a partir de un solo origen esto requeriría alrededor de 3 semanas (30.000 minutos). El proble-

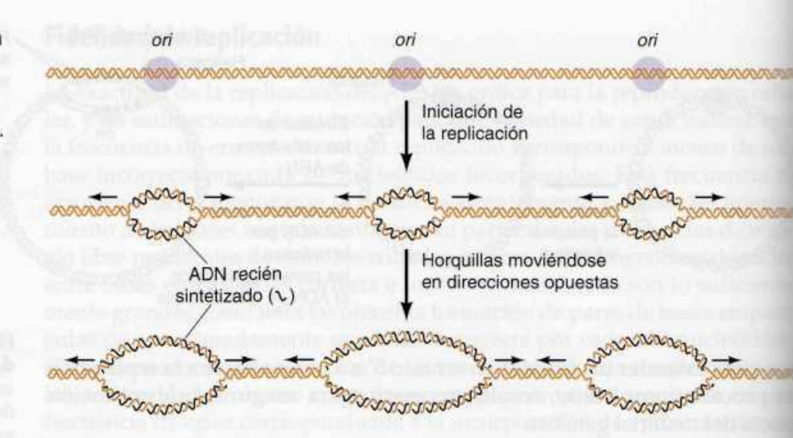


Figura 6.13 Orígenes de replicación en los cromosomas eucariotas. La replicación se inicia en múltiples orígenes (*ori*), cada uno de los cuales produce dos horquillas de replicación.

ma se exacerba por el hecho de que el ritmo de la replicación del ADN en las células de mamíferos es diez veces menor que en *E. coli*, posiblemente como resultado del empaquetamiento del ADN eucariota en cromatina. No obstante, el genoma de las células de mamíferos se replica en pocas horas, necesitando el uso de miles de orígenes de replicación.

La presencia de múltiples orígenes de replicación en las células eucariotas se demostró por primera vez mediante la exposición de un cultivo de células de mamíferos a timidina radiactiva durante intervalos de tiempo diferentes, seguido de una autorradiografía para detectar el ADN recién sintetizado. Los resultados de estos estudios indicaron que la síntesis de ADN se inicia en múltiples sitios, desde donde se prosigue en ambas direcciones a lo largo del cromosoma (Fig. 6.13). Los orígenes de replicación de las células de mamíferos se encuentran separados por intervalos de 50 a 300 kb aproximadamente; por lo que el genoma humano tiene alrededor de 30.000 orígenes de replicación. Los genomas de eucariotas simples también tienen múltiples orígenes; por ejemplo, la replicación en levaduras se inicia en orígenes separados por unas 40 kb.

Los orígenes de replicación de los cromosomas eucariotas han sido estudiados en levaduras *S. cerevisiae*, en las que se han identificado como secuencias que pueden soportar la replicación de plásmidos en células transformadas (Fig. 6.14). Esto ha proporcionado un ensayo funcional para estas secuencias, y el aislamiento de otros muchos elementos (llamados **secuencias de replicación autónoma**, o **ARS**, por las siglas del inglés *autonomously replicating sequences*). El papel de los orígenes de replicación se ha verificado por un análisis bioquímico directo, no solo en plásmidos sino también en el ADN cromosómico de levaduras.

Los elementos funcionales ARS se expanden alrededor de 100 pares de bases, incluyendo una secuencia central de 11 pares de bases común a muchos ARS diferentes (Fig. 6.15). Esta secuencia central es esencial para la función de los elementos ARS y se sabe que es el sitio de unión para un complejo (llamado **complejo del origen de replicación**, o **ORC**, *origin replication complex*) que es necesario para la iniciación de la replicación del ADN en los orígenes de las levaduras. El complejo ORC parece reclutar a otras proteínas (incluidas la MCM ADN helicasas) en el origen, lo que conduce a iniciar la replicación. El mecanismo de iniciación de la replicación del ADN en levaduras parece por tanto similar al de los virus procariotas y eucariotas; es decir, una proteína de iniciación se une a secuencias de ADN concretas que definen un origen de replicación.

Estudios subsiguientes han demostrado que el papel de las proteínas ORC como iniciadores de la replicación está conservado en todos los euca-

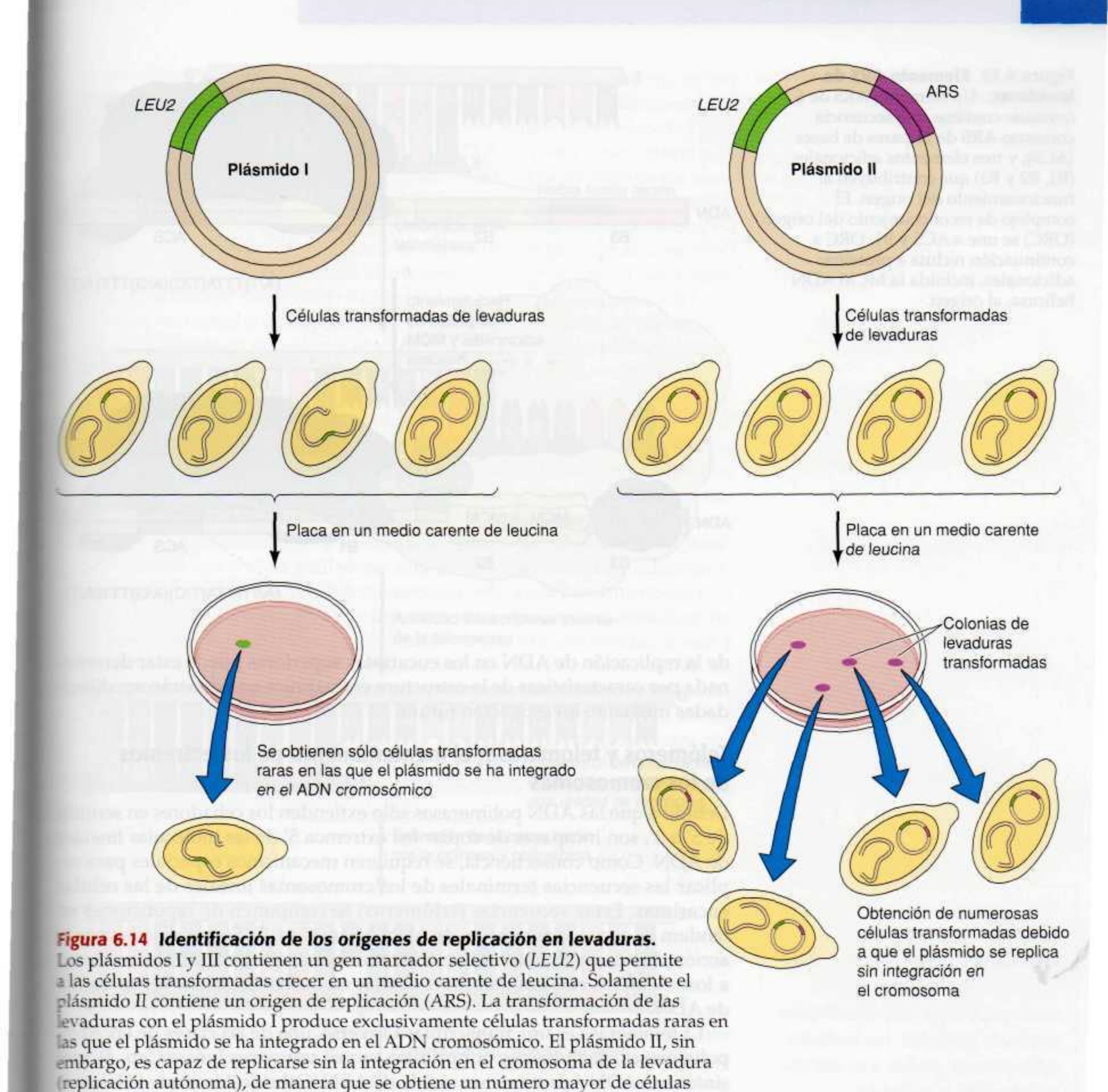


Figura 6.14 *Identificación de los orígenes de replicación en levaduras.* Los plásmidos I y III contienen un gen marcador selectivo (*LEU2*) que permite a las células transformadas crecer en un medio carente de leucina. Solamente el plásmido II contiene un origen de replicación (ARS). La transformación de las levaduras con el plásmido I produce exclusivamente células transformadas raras en las que el plásmido se ha integrado en el ADN cromosómico. El plásmido II, sin embargo, es capaz de replicarse sin la integración en el cromosoma de la levadura (replicación autónoma), de manera que se obtiene un número mayor de células transformadas a partir de su introducción en las células de levaduras.

riotas, desde las levaduras hasta los mamíferos. Sin embargo, los orígenes de replicación de otros eucariotas están mucho peor definidos que los elementos ARS de *S. cerevisiae*. En la levadura de fisión *S. pombe*, las secuencias de origen se encuentran dispersas sobre aproximadamente 0,5 y 1 kb de ADN. Los orígenes de *S. pombe* carecen del sitio de unión claramente definido para ORC que poseen los elementos ARS de *S. cerevisiae*, pero contienen repeticiones de secuencias ricas en A/T que parecen actuar como puntos de unión para el complejo ORC de *S. pombe*. En *Drosophila* y en células de mamífero, sin embargo, las proteínas ORC no parecen reconocer secuencias específicas de ADN. Por el contrario, los sitios de unión de ORC e iniciación

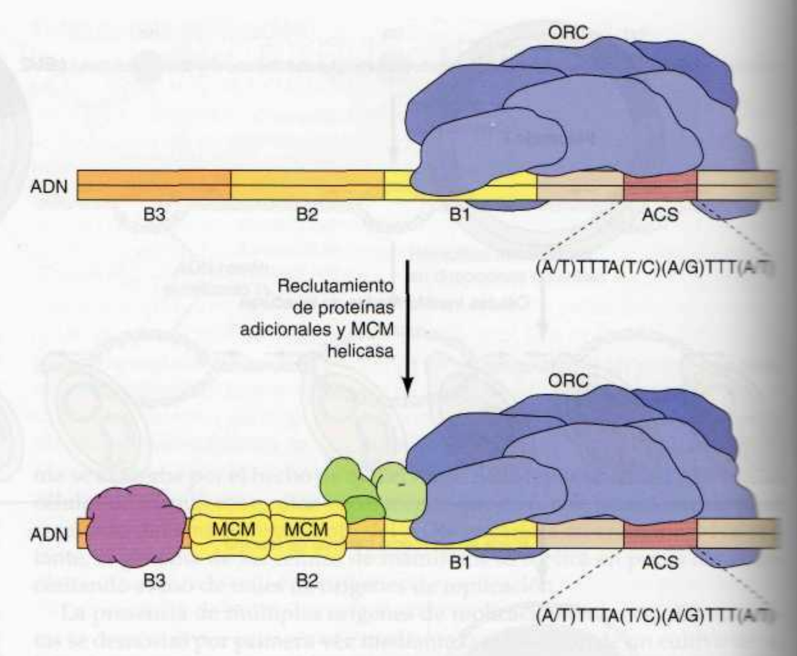


Figura 6.15 Elemento ARS de levaduras. Un elemento ARS de *S. cerevisiae* contiene una secuencia consenso ARS de 11 pares de bases (ACS), y tres elementos adicionales (B1, B2 y B3) que contribuyen al funcionamiento del origen. El complejo de reconocimiento del origen (ORC) se une a ACS y B1. ORC a continuación recluta a proteínas adicionales, incluida la MCM ADN helicasa, al origen.

de la replicación de ADN en los eucariotas superiores puede estar determinada por características de la estructura cromatínica que deberán ser dilucidadas mediante investigación futura.

Telómeros y telomerasa: el mantenimiento de los extremos de los cromosomas

Debido a que las ADN polimerasas sólo extienden los cebadores en sentido de 5′ a 3′, son incapaces de copiar los extremos 5′ de las moléculas lineales de ADN. Como consecuencia, se requieren mecanismos especiales para replicar las secuencias terminales de los cromosomas lineales de las células eucariotas. Estas secuencias (**telómeros**) se componen de repeticiones en tándem de secuencias simples de ADN (véase Cap. 5). Son replicadas por la acción de una enzima única llamada **telomerasa**, que es capaz de mantener a los telómeros catalizando de su síntesis en ausencia de una hebra molde de ADN.

La telomerasa es una **transcriptasa inversa**, una de las clases de las ADN polimerasas, descubiertas por primera vez en retrovirus (véase Cap. 4), que sintetizan ADN a partir de un molde de ARN. Cabe destacar que la telomerasa porta su propio molde de ARN, que es complementario a las secuencias repetidas de los telómeros, como parte del complejo enzimático. El uso de este ARN como molde permite a la telomerasa generar múltiples copias de las secuencias repetidas teloméricas, manteniendo por tanto a los telómeros en la ausencia de un molde de ADN convencional para dirigir su síntesis.

El mecanismo de acción de la telomerasa fue descubierto en 1985 por Carol Greider y Elizabeth Blackburn con los estudios del protozoo *Tetrahymena* (Fig. 6.16). La telomerasa de *Tetrahymena* está unida a un ARN de 159-nucleótidos de longitud que incluye la secuencia 3′-AACCCCAAC-5′. Esta secuencia es complementaria a la repetición telomérica de *Tetrahymena* (5′-TTGGGG-3′) y sirve como molde para la síntesis del ADN telomérico. La utilización de este ARN como molde permite a la telomerasa extender el extremo 3′ del ADN cromosómico una unidad de repetición detrás de su longitud original. La hebra complementaria puede ser entonces sintetizada

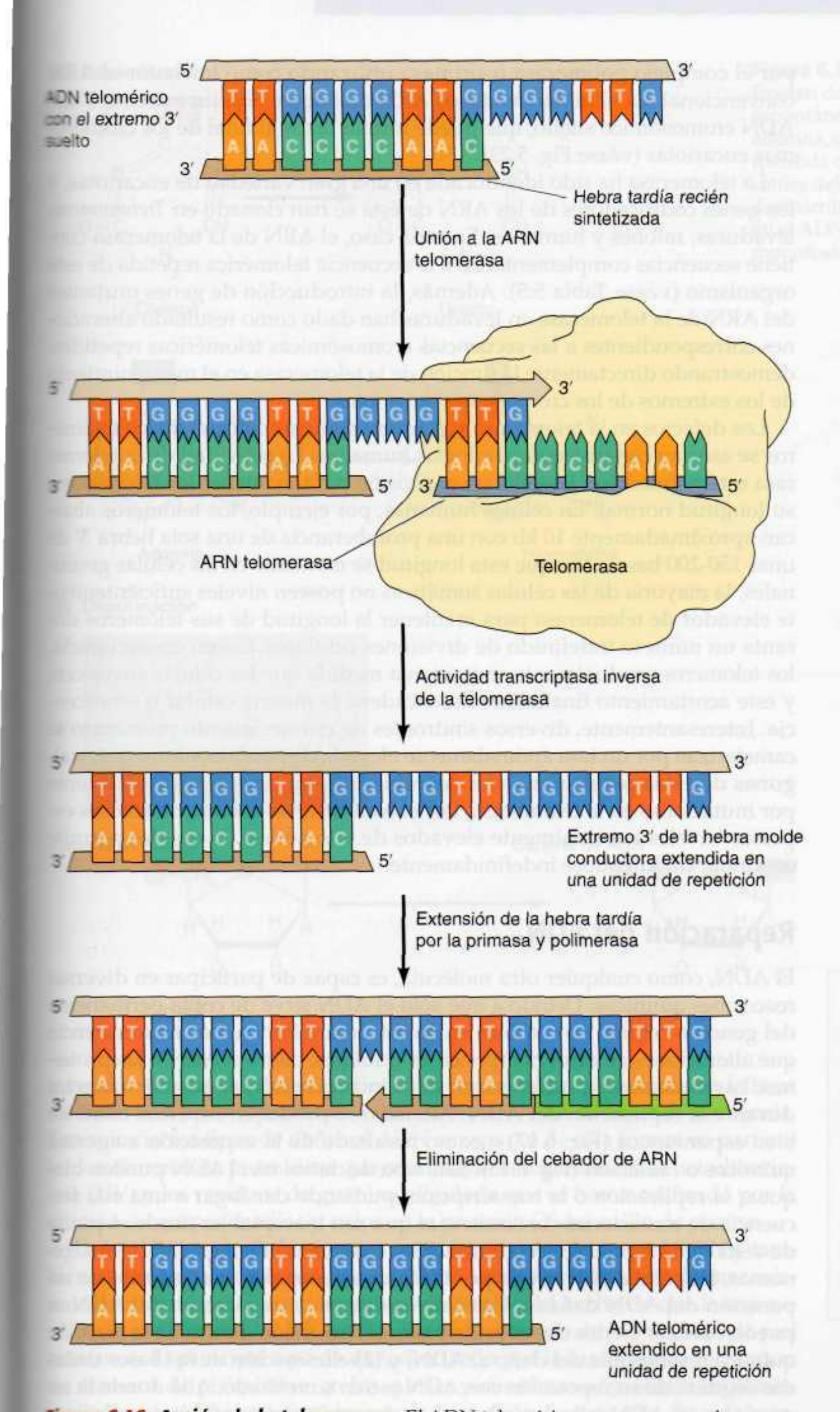


Figura 6.16 Acción de la telomerasa. El ADN telomérico es una secuencia repetida simple con un extremo 3′ suelto en la hebra conductora recién sintetizada. La telomerasa lleva consigo su propia molécula de ARN, que es complementaria al ADN telomérico, como parte del complejo enzimático. El extremo suelto del ADN telomérico se une al ARN de la telomerasa, que luego servirá como molde para la extensión de la hebra molde conductora en una unidad más de repetición. La hebra tardía del ADN telomérico puede ser a su vez sintetizada mediante iniciación convencional de ARN y actividad polimerasa del ADN.

por el complejo polimerasa α-primasa utilizando como iniciador al ARN convencional. La eliminación de los ARN cebadores deja un extremo 3′ del ADN cromosómico suelto, que puede formar lazos al final de los cromosomas eucariotas (véase Fig. 5.23).

La telomerasa ha sido identificada en una gran variedad de eucariotas, y los genes codificadores de los ARN de ésta se han clonado en *Tretahymena*, levaduras, ratones y humanos. En cada caso, el ARN de la telomerasa contiene secuencias complementarias a la secuencia telomérica repetida de este organismo (véase Tabla 5.5). Además, la introducción de genes mutantes del ARN de la telomerasa en levaduras han dado como resultado alteraciones correspondientes a las secuencias cromosómicas teloméricas repetidas, demostrando directamente la función de la telomerasa en el mantenimiento de los extremos de los cromosomas eucariotas.

Los defectos en la telomerasa y el mantenimiento normal de los telómeros se asocian con diversas patologías humanas. La actividad de la telomerasa está regulada en las células en división para mantener los telómeros a su longitud normal. En células humanas, por ejemplo, los telómeros abarcan aproximadamente 10 kb con una protuberancia de una sola hebra 3′ de unas 150-200 bases. Aunque esta longitud se mantiene en las células germinales, la mayoría de las células somáticas no poseen niveles suficientemente elevados de telomerasa para mantener la longitud de sus telómeros durante un número indefinido de divisiones celulares. Como consecuencia, los telómeros gradualmente se acortan a medida que las células envejecen, y este acortamiento finalmente desencadena la muerte celular o senescencia. Interesantemente, diversos síndromes de envejecimiento prematuro se caracterizan por un tasa anómalamente elevada de pérdida telomérica, y algunas de estas patologías se ha descubierto estar causadas directamente por mutaciones en la telomerasa. Por el contrario, las células cancerosas expresan niveles anormalmente elevados de telomerasa, lo que les permite continuar dividiéndose indefinidamente.

Reparación del ADN

■ El campeón reparador de ADN: La bacteria *Deinococcus radiodurans* fue aislada en 1956 a partir de latas de carne que se creía que habían sido esterilizadas mediante radiación. Las bacterias sobrevivieron gracias a su extrema resistencia a la radiación. *D. radiodurans* es unas cien veces más resistente a la radiación ionizante que *E. coli*.

El ADN, como cualquier otra molécula, es capaz de participar en diversas reacciones químicas. Debido a que sólo el ADN sirve de copia permanente del genoma celular los cambios en su estructura tienen más trascendencia que alteraciones en otros componentes celulares, como el ARN o las proteínas. Las mutaciones pueden surgir de la incorporación de bases incorrectas durante la replicación del ADN. Además, se producen diversos cambios bien espontáneos (Fig. 6.17) o como resultado de la exposición a agentes químicos o radiación (Fig. 6.18). Este tipo de daños en el ADN pueden bloquear la replicación o la transcripción, pudiendo dar lugar a una alta frecuencia de mutaciones-consecuencias que son inaceptables desde el punto de vista de la reproducción celular. Para mantener la integridad de sus genomas, las células han tenido por tanto que desarrollar mecanismos de reparación del ADN dañado. Estos mecanismos de reparación del ADN se pueden dividir en dos clases principales: (1) inversión directa de la reacción química responsable del daño al ADN, y (2) eliminación de las bases dañadas seguida de su reposición con ADN recién sintetizado. Allá donde la reparación del ADN falla, las células han desarrollado mecanismos adicionales que permiten a estas acabar con los daños.

Inversión directa del ADN dañado

La mayoría de los daños producidos en el ADN son reparados mediante la eliminación de las bases dañadas seguida de la síntesis de la región escindida. Algunas lesiones en el ADN, sin embargo, se pueden reparar mediante

(A) Desaminación

NH₂ → O; Citosina → Uracilo

NH₂ → O; Adenina → Hipoxantina

(B) Depurinación

Cadena de ADN; dGMP → Cadena de ADN; OH; Sitio AP

Figura 6.17 Daño espontáneo del ADN. Existen dos formas fundamentales de daño espontáneo del ADN: (A) desaminación de adenina, citosina y guanina, y (B) depurinación (pérdida de bases de purina) a causa de la rotura del enlace entre las bases de purina y la desoxirribosa, dejando un sitio apurínico (AP) en el ADN. dGMP = desoxiguanosina monofosfato.

inversión directa del daño, pudiendo ser un camino más eficiente a la hora de tratar con tipos específicos de daños al ADN que se dan con frecuencia. Tan solo ciertos tipos de daños al ADN se reparan de esta forma, en particular los dímeros de pirimidina que resultan de la exposición a la luz ultravioleta (UV) y los residuos de guanina alquilada que se han modificado por la adición de grupos metilos y etilos en la posición O^6 del anillo de purina.

La luz UV es una de las fuentes más importantes de daño al ADN y también es la forma más estudiada de ADN dañado en términos de mecanismos de reparación. Su importancia se ilustra por el hecho de que la exposición a la radiación solar UV es la causa de la mayoría de los cánceres de piel humanos. El principal tipo de daño inducido por la luz UV es la formación de **dímeros de pirimidina**, en los que las pirimidinas adyacentes en la misma hebra de ADN están unidas por la formación de un anillo de ciclobutano que resulta de la saturación de los dobles enlaces entre el carbono 5 y el 6 (véase Fig. 6.18A). La formación de dichos dímeros distorsiona la estructura de la cadena de ADN y bloquea la transcripción o replicación al pasar por el daño, de manera que su reparación está relacionada con la capacidad de las células para sobrevivir a la radiación. Uno de los mecanismos de reparación de los dímeros de pirimidina inducidos por UV es la inversión directa

(A) **Exposición a la luz UV**

Timinas adyacentes en el ADN

Dímero de timina

Anillo de ciclobutano

(B) **Alquilación**

Guanina

O^6-metilguanina

(C) **Reacción con un carcinógeno**

Guanina

Adición de un grupo voluminoso

Figura 6.18 Ejemplos de daños al ADN inducidos por radiación y agentes químicos. (A) La luz UV induce la formación de dímeros de pirimidina, en los que dos pirimidinas adyacentes (p. ej., timinas) se unen mediante un ciclobutano en estructura de anillo. (B) La alquilación es la adición de grupos metilo o etilo en posiciones diversas en las bases de ADN. En este ejemplo, la alquilación de la guanina en posición O^6 da lugar a la formación de una O^6- metilguanina. (C) Muchos carcinógenos (p. ej., benzo-(*a*)pireno) reaccionan con las bases del ADN, produciendo la adición de grupos químicos voluminosos a la molécula de ADN.

de la reacción de dimerización. El proceso se denomina **fotorreactivación** puesto que la energía derivada de la luz visible se utiliza para romper el anillo ciclobutano (Fig. 6.19). Las bases originales de pirimidina continúan en el ADN, ahora repuestas a su estado normal. Tal y como se esperaría del hecho de que la radiación solar UV es la fuente principal de daños al ADN en diversos tipos de células, la reparación por fotoactivación de los dímeros de pirimidina es común en una variedad de células procariotas y eucariotas, incluyendo *E. coli*, levaduras y algunas especies de plantas y animales. Curiosamente, sin embargo, la fotorreactivación no es universal; mamíferos placentarios (incluyendo los humanos) carecen de este mecanismo de reparación del ADN.

Otra forma de reparación directa corresponde al daño producido por la reacción entre agentes alquilantes y el ADN. Los agentes alquilantes son

compuestos reactivos que son capaces de transferir grupos metilo y etilo a una base de ADN, modificando por tanto químicamente la base (véase Fig. 6.18B). Un tipo de daño particularmente importante es la metilación de la guanina en posición O^6, debido a que el producto, O^6-metilguanina, forma pares de bases complementarias con timina en lugar de citosina. Esta lesión puede ser reparada por una enzima (llamada O^6-metilguanina metiltransferasa) que transfiere el grupo metilo desde la O^6-metilguanina al sitio activo de un residuo de cisteína (Fig. 6.20). Por tanto se elimina la modificación química mutagénica potencial, y se restaura la guanina original. Las enzimas que catalizan esta reacción directa de reparación se encuentran en abundancia en procariotas y eucariotas, incluidos los humanos.

Reparación por escisión

Aunque la reparación directa es una manera eficiente de tratar con tipos particulares de daños al ADN, la reparación por escisión abarca la reparación de gran variedad de alteraciones químicas en el ADN. En consecuencia, los diferentes tipos de reparación por escisión son los mecanismos más importantes de reparación del ADN en las células procariotas y eucariotas. En la reparación por escisión, el ADN dañado es reconocido y eliminado, como bases independientes o como nucleótidos. El espacio vacío generado se rellena con la síntesis de una nueva hebra de ADN, utilizando la hebra complementaria no dañada como molde. Los tres tipos de reparación por escisión —reparación por escisión de base, reparación por escisión de nucleótido y reparación del desapareamiento— permiten a las células resolver una variedad de tipos diferentes de ADN dañado.

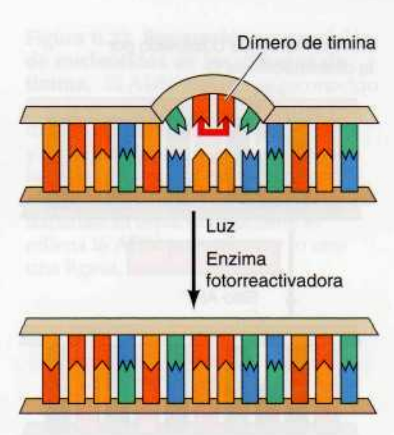
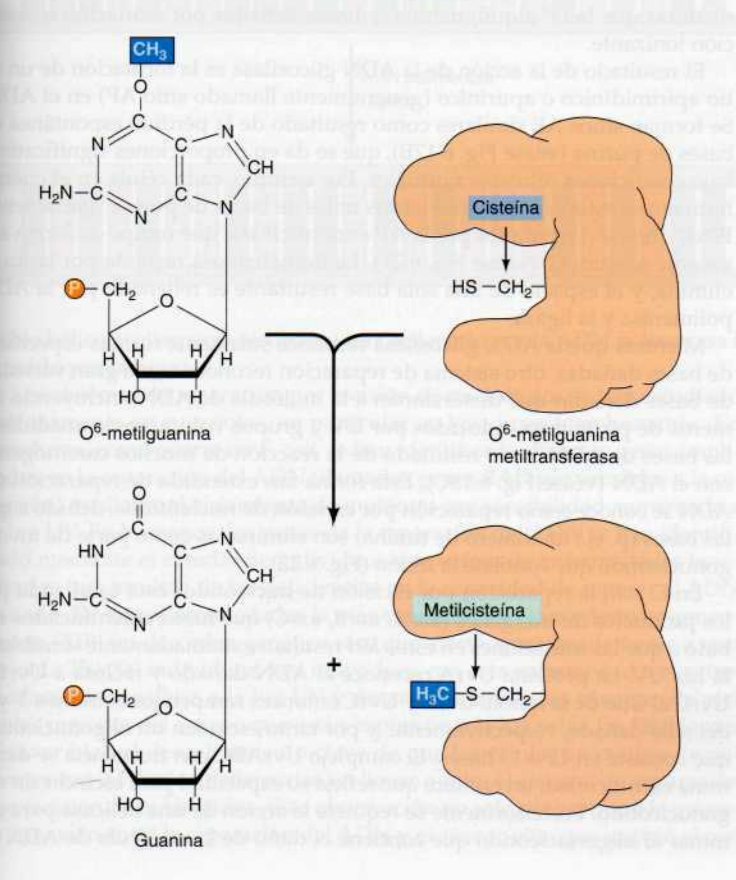
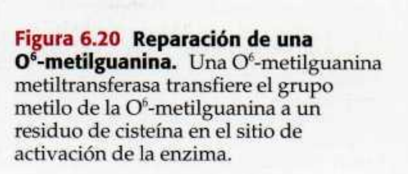


Figura 6.19 Reparación directa de un dímero de timina. Los dímeros de timina inducidos por la radiación UV se pueden reparar mediante fotorreactivación, en la que la energía procedente de la luz visible se utiliza para dividir los enlaces formados en el anillo de ciclobutano.




Figura 6.20 Reparación de una O^6-metilguanina. Una O^6-metilguanina metiltransferasa transfiere el grupo metilo de la O^6-metilguanina a un residuo de cisteína en el sitio de activación de la enzima.

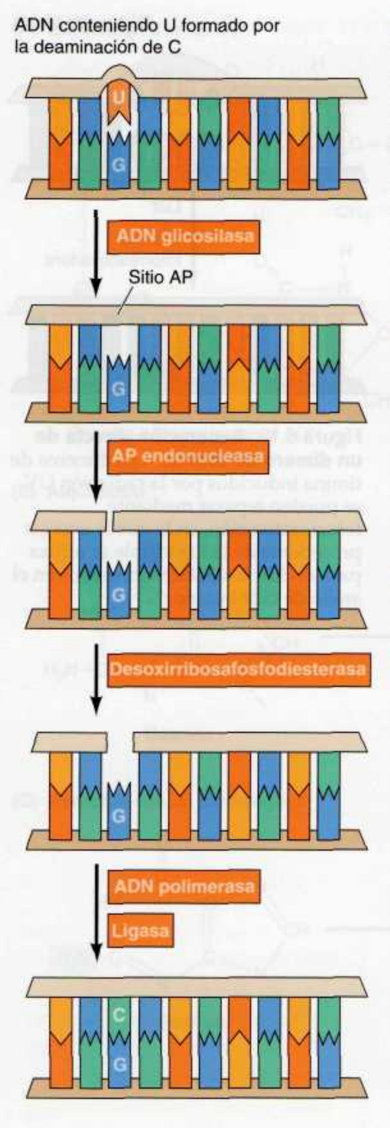


Figura 6.21 Reparación por escisión de bases. En este ejemplo, el uracilo (U) se ha formado por desaminación de la citosina (C) y es por tanto opuesto a una guanina (G) en la hebra complementaria del ADN. El enlace entre el uracilo y la desoxirribosa lo rompe una ADN glicosilasa, dejando un azúcar sin base unido al ADN (un sitio AP). El sitio es reconocido por una AP endonucleasa, que rompe la cadena de ADN. La desoxirribosa restante es eliminada por la desoxirribosafosfodiesterasa. El espacio que resulta lo rellena la ADN polimerasa y lo une una ligasa, conduciendo a la incorporación de la base correcta (C) opuesta a G.

La reparación de un ADN que contiene uracilo es un buen ejemplo de la **reparación por escisión de base**, en la que bases dañadas de forma única son reconocidas y eliminadas de la molécula de ADN (Fig. 6.21). El uracilo puede surgir en el ADN por dos mecanismos: (1) el uracilo (como dUTP [desoxiuridina trifosfato]) se incorpora ocasionalmente en el lugar de una timina durante la síntesis del ADN, y (2) el uracilo se puede formar en el ADN por la desaminación de una citosina (véase Fig. 6.17A). El segundo mecanismo es de mayor importancia biológica puesto que altera el patrón normal de pares de bases complementarias lo que representa un acontecimiento mutagénico. La escisión del uracilo en el ADN está catalizada por la **ADN glicosilasa**, una enzima que rompe el enlace de unión de la base de uracilo con el esqueleto de desoxirribosa del ADN. Esta reacción produce un uracilo libre y un sitio apirimidínico —un azúcar sin base—. La ADN glucosilasa también reconoce y elimina otras bases anómalas, incluyendo la hipoxantina formada por la desaminación de adenina, purinas alquiladas distintas que la O^6-alquilguanina, y bases dañadas por oxidación o radiación ionizante.

El resultado de la acción de la ADN glicosilasa es la formación de un sitio apirimidínico o apurínico (generalmente llamado sitio AP) en el ADN. Se forman sitios AP similares como resultado de la pérdida espontánea de bases de purina (véase Fig. 6.17B), que se da en proporciones significativas bajo condiciones celulares normales. Por ejemplo, cada célula en el cuerpo humano se estima que pierde varios miles de bases de purina diariamente. Estos sitios son reparados por la **AP endonucleasa**, que rompe de forma adyacente al sitio AP (véase Fig. 6.21). La desoxirribosa restante por tanto se elimina, y el espacio de una sola base resultante es rellenado por la ADN polimerasa y la ligasa.

Mientras que la ADN glicosilasa reconoce solamente formas específicas de bases dañadas, otro sistema de reparación reconoce a una gran variedad de bases dañadas que distorsionan a la molécula de ADN, incluyendo dímeros de pirimidina inducidos por UV y grupos voluminosos añadidos a las bases de ADN como resultado de la reacción de muchos carcinógenos con el ADN (véase Fig. 6.18C). Esta forma tan extendida de reparación del ADN se conoce como **reparación por escisión de nucleótidos**, debido a que las bases (p. ej., un dímero de timina) son eliminadas como parte de un oligonucleótido que contiene la lesión (Fig. 6.22).

En *E. coli*, la reparación por escisión de nucleótidos está catalizada por los productos de tres genes (*uvrA, uvrB, uvrC*) que fueron identificados debido a que las mutaciones en estos *loci* resultan extremadamente sensibles a la luz UV. La proteína UvrA reconoce al ADN dañado y recluta a UvrB y UvrC al sitio de la lesión. UvrB y UvrC entonces rompen los extremos 3′ y 5′ del sitio dañado, respectivamente, y por tanto escinden un oligonucleótido que consiste en 12 o 13 bases. El complejo UvrABC con frecuencia se denomina **escinucleasa**, un nombre que refleja su capacidad para escindir un oligonucleótido. Posteriormente se requiere la acción de una helicasa para eliminar al oligonucleótido que contiene el daño de la molécula de ADN de

T T

Reconocimiento del daño
Corte por nucleasa

T T

Figura 6.22 Reparación por escisión de nucleótidos de los dímeros de timina. El ADN dañado es reconocido y después cortado a ambos lados del dímero de timina por las nucleasas 3′ y 5′. El desenrollamiento por una helicasa produce la escisión de un oligonucleótido que contiene las bases dañadas. El espacio resultante lo rellena la ADN polimerasa y lo une una ligasa.



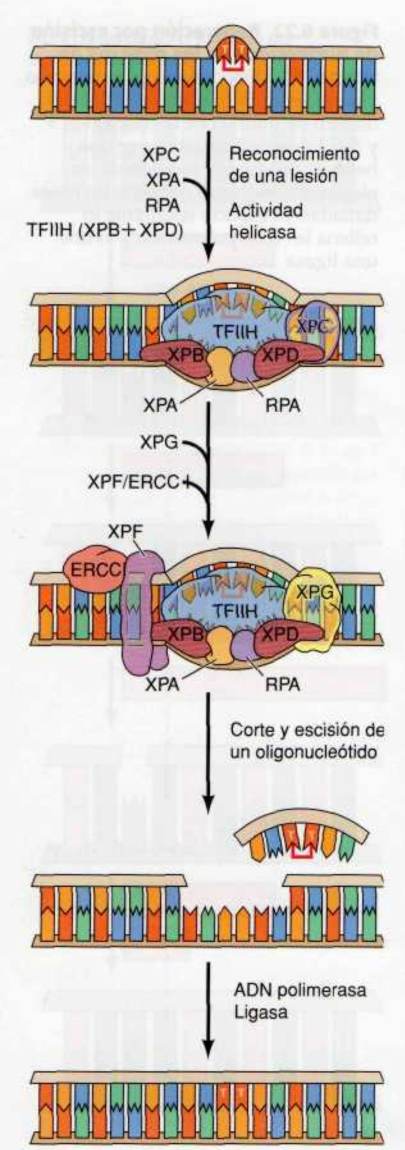


Figura 6.23 Reparación mediante escisión de nucleótidos en células de mamífero. XPC reconoce las lesiones en el ADN (como un dímero de timidina), lo que induce la unión de XPA, RPA y TFIIH, que contiene las helicasas XPB y XPD. Tras el desenrollamiento del ADN por XPB y XPD, las endonucleasas XPG y XPF/ERCC1 se incorporan al complejo para llevar a cabo la escisión del ADN con eliminación del oligonucleótido dañado. La ADN polimerasa rellena el hueco así creado que será sellado por una ligasa.

de células XP como sistema experimental para identificar a los genes humanos reparadores del ADN. La identificación de los genes humanos reparadores del ADN se ha llevado a cabo mediante estudios no solo con células XP, sino con otras dos enfermedades humanas que resultan de defectos en la reparación del ADN (Síndrome de Cockayne y tricotiodistrofia) y con mutantes sensibles a UV procedentes de líneas celulares de roedores. La disponibilidad de células de los mamíferos con defectos en la reparación del ADN ha permitido la clonación de genes reparadores basada en la capacidad de los alelos de tipo salvaje de restaurar la sensibilidad normal al UV en las células mutantes mediante ensayos de transferencia de genes, dejando una puerta abierta a los análisis experimentales de reparación por escisión de nucleótidos en las células de los mamíferos.

La clonación molecular hasta ahora ha identificado siete genes de reparación diferentes (designados desde *XPA* hasta *XPG*) que mutados en los casos de xeroderma pigmentosum, como en algunos casos de síndrome de Cockayne, tricotiodistrofia, y mutantes sensibles a la radiación UV de células de roedores. Las proteínas codificadas por estos genes de reparación del ADN de mamíferos están muy relacionadas con las proteínas codificadas por los genes *RAD* de levaduras, lo que indica que la reparación por escisión de nucleótidos está muy conservada entre los eucariotas. Con la disponibilidad de genes de reparación de levaduras y mamíferos clonados, ha sido posible purificar las proteínas que codifican y desarrollar sistemas *in vitro* para estudiar sus papeles en el proceso de reparación (Fig. 6.23). El paso inicial de la reparación por escisión en las células de mamífero implica el reconocimiento de alteraciones del emparejamiento de bases por parte de XPC, seguida de la unión cooperativa de XPA, XPC y la proteína de unión a ADN de hebra sencilla, la proteína de replicación A (RPA: *replication protein* A) estudiada antes en este capítulo (véase Fig. 6.8) y un factor de transcripción. XPC está asociada con un factor de transcripción multisubunidad denominado TFIIH, que es necesario para iniciar la transcripción de los genes eucariotas (véase Cap. 7). En algunos casos, XPE puede intervenir también en el reconocimiento de lesiones. Dos de las subunidades de TFIIH son las proteínas XPB y XPD, que actúan como helicasas para desenrollar aproximadamente 25 pares de bases de ADN en torno a la zona de lesión. La proteína XPG es entonces reclutada al complejo, seguido del reclutamiento de XPF formando un heterodímero con ERCC1 (una proteína de reparación identificada en células de roedor sensibles al UV). XPF1/ERCC1 y XPG son endonucleasas, que cortan el ADN en los extremos 5′ y 3′ de la región dañada, respectivamente. Estos cortes escinden un oligonucleótido que consiste en aproximadamente 30 bases. El hueco resultante es a continuación rellenado por la ADN polimerasa δ (en asociación con RFC y PCNA) y sellado mediante una ligasa.

A pesar de que el ADN dañado puede reconocerse a lo largo del genoma, una alternativa a la reparación por escisión de nucleótidos, denominada **reparación acoplada a la transcripción**, está dedicada específicamente a la reparación de lesiones en genes que son transcritos activamente (Fig. 6.24). Una conexión entre la transcripción y la reparación fue sugerida por primera vez por experimentos que mostraban que las hebras de ADN transcrito son reparadas más rápidamente que las hebras no transcritas tanto en *E. coli* como en células de mamífero. Puesto que las lesiones del ADN bloquean la transcripción, este acoplamiento de la reparación a la transcripción se cree ventajoso permitiendo a la célula reparar preferentemente las lesiones de los genes que se expresan activamente. Tanto en *E. coli* como en células de mamífero, el mecanismo de acoplamiento de la reparación a la transcripción implica el reconocimiento de la ARN polimerasa detenida en una lesión de la hebra de ADN que se está transcribiendo. En *E. coli*, la ARN polimerasa detenida es reconocida por una proteína denominada factor de

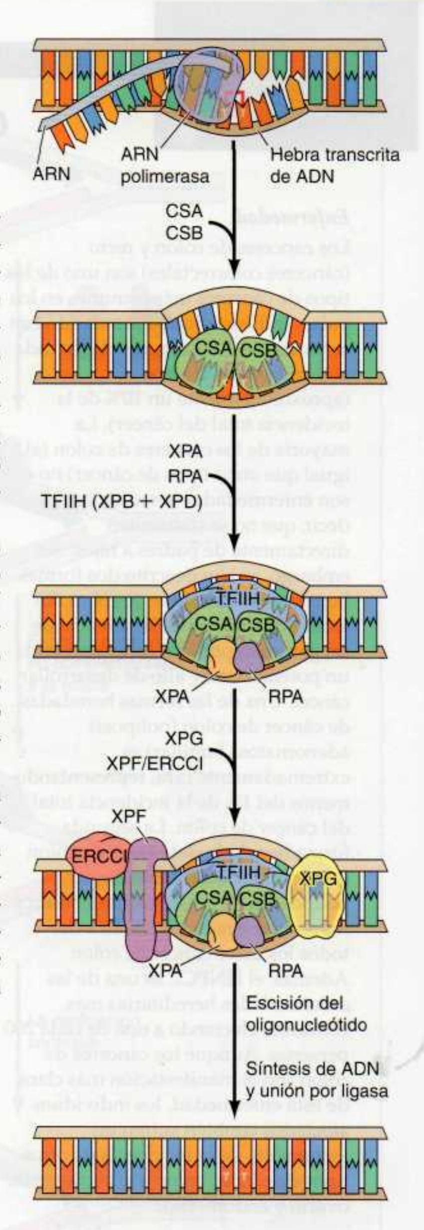


Figura 6.24 Reparación acoplada a la transcripción en células de mamífero. La ARN polimerasa se detiene debido a la presencia de una lesión (p. ej., un dímero de timidina) en la hebra transcrita del ADN. La polimerasa detenida recluta a CSA y CSB hacia la lesión, las cuales reclutan, a su vez, a XPA, RPA y TFIIH, y la reparación mediante escisión tiene lugar del modo descrito en la Figura 6.23.

acoplamiento de la reparación a la transcripción, que desplaza a la ARN polimerasa y recluta a la escinucleasa UvrABC a la zona de la lesión. En las células de mamífero, la reparación acoplada a la transcripción implica el reconocimiento de la ARN polimerasa por parte de dos proteínas (CSA y CSB) que están codificadas por los genes responsables del síndrome de Cockayne. Al contrario que en pacientes con xeroderma pigmentoso, los pacientes con el síndrome de Cockayne son deficientes específicamente en la reparación acoplada a la transcripción, lo que es consistente con el papel de CSA y CSB como factores acopladores de la reparación a la transcripción. Tras el reconocimiento de la polimerasa de ARN detenida, las proteínas CSA y CSB reclutan a XPA, RPA y TFIIH hacia la lesión del ADN y se produce una reparación por escisión de nucleótidos del modo descrito en la Figura 6.23.

Un tercer sistema de reparación reconoce a las bases no complementarias que se incorporan durante la replicación del ADN. Muchas de estas bases no complementarias se eliminan por la actividad de la doble lectura de la ADN polimerasa. Las que se pierden son el objetivo de una corrección posterior por parte del sistema de **reparación no complementaria**, que barre de nuevo al ADN replicado. Si se encuentra una no-complementariedad, las enzimas de este sistema de reparación son capaces de identificar y escindir la base no complementaria específicamente de la hebra de ADN recién replicada, permitiendo que se corrija el error y la secuencia original sea reemplazada.

En *E. coli*, la capacidad del sistema de reparación no complementaria para distinguir la hebra de ADN parental de la hebra de ADN recién sintetizada se basa en el hecho de que el ADN de esta bacteria se modifica por la metilación de los residuos de adenina en la secuencia GATC para formar 6-metiladenina (Fig. 6.25). Puesto que la metilación ocurre después de la replicación, las hebras de ADN recién sintetizadas, no están metiladas y pueden ser reconocidas específicamente por las enzimas del sistema de reparación no complementaria. La reparación no complementaria se inicia

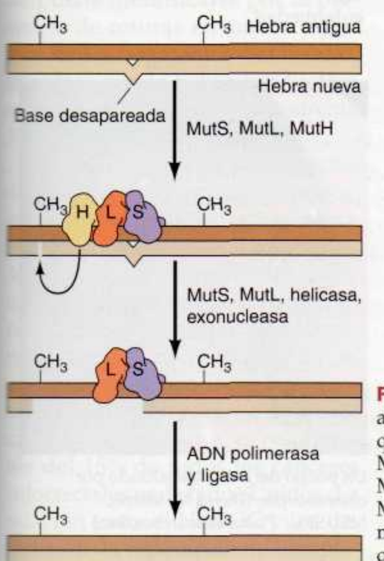


Figura 6.25 Reparación de apareamientos en *E. coli*. El sistema de reparación de apareamientos detecta y escinde las bases desapareadas en el ADN recién replicado, que se diferencia de la hebra parental debido a que todavía no ha sido metilada. MutS se une a la base desapareada, seguido de MutL. La unión a MutL activa a MutH, que rompe a la hebra no modificada opuesta al sitio de la metilación. MutS y MutL, junto con una helicasa y una exonucleasa, escinden la porción de la hebra no modificada que contiene el desapareamiento. La ADN polimerasa rellena el espacio que finalmente queda unido por la ligasa.



MEDICINA MOLECULAR

Cáncer de colon y reparación del ADN

Enfermedad

Los cánceres de colon y recto (cánceres colorrectales) son uno de los tipos de cánceres más comunes en los países industrializados, contando con cerca de 150.000 casos de cáncer cada año en Estados Unidos (aproximadamente un 10% de la incidencia total del cáncer). La mayoría de los cánceres de colon (al igual que otros tipos de cáncer) no son enfermedades hereditarias; es decir, que no se transmiten directamente de padres a hijos. Sin embargo, se han descrito dos formas hereditarias de cáncer de colon. En estos dos síndromes, la herencia de un gen susceptible al cáncer presenta un potencial muy alto de desarrollar cáncer. Una de las formas heredadas de cáncer de colon (poliposis adenomatosa familiar) es extremadamente rara, representando menos del 1% de la incidencia total del cáncer de colon. La segunda forma heredada del cáncer de colon (cáncer colorrectal hereditario no poliposo, o HNPCC) es más común y representa alrededor del 15% de todos los casos cáncer de colon. Además, el HNPCC es una de las enfermedades hereditarias más comunes, afectando a una de cada 200 personas. Aunque los cánceres de colon son la manifestación más clara de esta enfermedad, los individuos afectados también sufren un incremento de la incidencia de otros tipos de cáncer, como son el cáncer de ovario y endometrio.

Bases moleculares y celulares

Igual que otros cánceres, el cáncer colorrectal es el resultado de mutaciones producidas en genes que regulan la proliferación celular, conduciendo al crecimiento incontrolado de las células cancerígenas. En la mayoría de los casos estas mutaciones ocurren de forma esporádica en las células somáticas. En los cánceres hereditarios, sin embargo, las mutaciones de la línea germinal predisponen al individuo a desarrollar el cáncer.

En 1993 se produjo un avance extraordinario con el descubrimiento de que un gen responsable de aproximadamente el 50% de los casos de HNPCC codificaba a una enzima implicada en la reparación de los apareamientos en el ADN; este gen es un homólogo humano del gen de *E. coli MutS*. Estudios posteriores han demostrado que otros tres genes, responsables de la mayoría de los casos restantes de HNPCC, son homólogos de *MutL* y que por tanto están implicados en el proceso de reparación de apareamientos. Los defectos en estos genes parecen corresponderse con una alta frecuencia de mutaciones en otros genes celulares, y a su vez con una alta probabilidad de que algunas de estas mutaciones conduzcan eventualmente al desarrollo del cáncer por afectar a genes que regulan la proliferación celular.

Prevención y tratamiento

De manera similar a otras enfermedades hereditarias, la identificación de los genes responsables de HNPCC permite que los individuos con riesgo de heredar el cáncer sean identificados a través de una prueba genética. Además, el diagnóstico genético prenatal podría ser de vital importancia para los portadores de mutaciones HNPCC que planean tener descendencia. No obstante, los beneficios potenciales de la detección de estas mutaciones no se limitan a prevenir la transmisión de genes mutantes a la siguiente generación; su detección también puede ayudar a prevenir el desarrollo del cáncer en individuos afectados.

En términos de prevención de la enfermedad, una de las características claves del cáncer de colon es su desarrollo gradual durante varios años. El diagnóstico temprano de la enfermedad mejora sustancialmente las posibilidades de supervivencia del paciente. La fase inicial de desarrollo del cáncer de colon es el crecimiento de pequeños pólipos benignos, que con el tiempo se transformaran en malignos e invadirán el tejido conectivo de su alrededor. Anterior al desarrollo de la malignidad, sin embargo, los pólipos se pueden eliminar quirúrgicamente con facilidad, previniendo de forma eficaz el crecimiento de un tumor maligno. Los pólipos y las primeras fases del cáncer de colon se pueden detectar a través del examen del colon con un tubo delgado iluminado (colonoscopia), de manera que la colonoscopia frecuente en pacientes con HNPCC podría permitir la eliminación de los pólipos antes de que el cáncer se desarrolle. Además, diversos medicamentos se han estado probando como inhibidores potenciales del desarrollo del cáncer de colon, pudiendo resultar un gran beneficio para los pacientes con HNPCC. Permitiendo la aplicación controlada de tales medidas preventivas, la identificación de mutaciones responsables de HNPCC podría contribuir de manera significante a la prevención de la enfermedad.



Un pólipo del colon visualizado por colonoscopia. (David M. Martin, MD/SPL/ Photo Researches, Inc.)

mentaria se descubrió en 1993, cuando dos grupos de investigación clonaron al homólogo humano de *MutS* y encontraron que las mutaciones en este gen eran las responsables de casi la mitad de todos los casos de HNPCC. Estudios posteriores han demostrado que la mayoría de los casos restantes de HNPCC están causados por mutaciones en uno de los tres genes humanos que son homólogos a *MutL*. Defectos en estos genes parecen resultar en una elevada frecuencia de mutaciones en otros genes celulares, con una elevada probabilidad correspondiente de que alguna de estas mutaciones finalmente desencadene el desarrollo de cáncer.

Síntesis de ADN translesión

Los sistemas de reversión directa y la reparación por escisión actúan para corregir daños del ADN antes de la replicación, para que la síntesis de ADN replicativo pueda proceder empleando una hebra de ADN no dañada como molde. Si estos sistemas fallasen, sin embargo, la célula posee mecanismos alternativos para tratar el ADN dañado en la horquilla de replicación. Los dímeros de pirimidina y muchos otros tipos de lesiones no pueden copiarse por la acción normal de las ADN polimerasas, así que la replicación se bloquea en puntos con dichas lesiones. Sin embargo, las células también poseen varias ADN polimerasas especializadas capaces de replicar a través de un punto de ADN dañado. La replicación del ADN dañado por estas polimerasas especializadas, denominada **síntesis de ADN translesión**, proporciona un mecanismo por el que la célula puede cuentear la lesión del ADN en el horquilla de replicación, que puede ser corregido tras completar la replicación.

La primera ADN polimerasa especializada responsable de síntesis de ADN translesión fue descubierta en *E. coli* en 1999. Esta enzima, denominada polimerasa V, es inducida en respuesta a una extensa irradiación UV y puede sintetizar una nueva hebra de ADN opuesta a un dímero de timina (Fig. 6.27). Otras dos ADN polimerasas de *E. coli*, las polimerasas II y IV, se inducen de forma similar por el ADN lesionado y funcionan en síntesis translesión. Las células eucarióticas también contienen múltiples ADN polimerasas especializadas, y se han descrito, al menos, cinco enzimas que intervienen en la síntesis translesión en las células de mamífero. Estas polimerasas especializadas sustituyen a la polimerasa normal que ha quedado detenida ante una lesión del ADN. Son capaces de hacer proseguir la síntesis en el lugar de la lesión, después de lo cual serán sustituidas de nuevo por la polimerasa replicativa normal.

Todas las ADN polimerasas especializadas muestran una baja fidelidad cuando copian ADN no dañado y carecen de la actividad correctora $3' \rightarrow 5'$ (véase Fig. 6.11), por lo que sus tasas de error son entre 100 y 10.000 veces mayores que las tasas de error de las ADN polimerasas replicativas normales (como la polimerasa III en *E. coli* o las polimerasas δ y ε en células eucarióticas). No obstante, poseen una cierta selectividad en la inserción de la base correcta en la posición opuesta a algunos tipos de lesiones del ADN, aunque tienden a cometer errores al insertar bases en la posición opuesta a otras variantes de daños o al sintetizar ADN a partir de un molde normal sin lesiones.

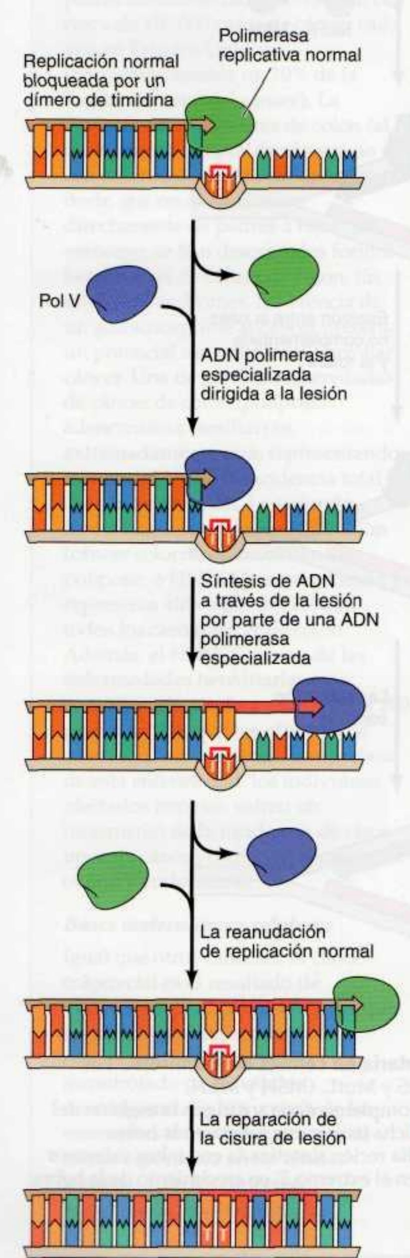


Figura 6.27 Síntesis de ADN translesión. La replicación normal es bloqueada por un dímero de timina, pero las ADN polimerasas especializadas como la polimerasa V (pol V) reconocen y continúan la síntesis de ADN a lo largo de la lesión. Es posible entonces reanudar la replicación mediante la ADN polimerasa replicativa normal y el dímero de timidina eliminado posteriormente por reparación de escisión de nucleótidos.

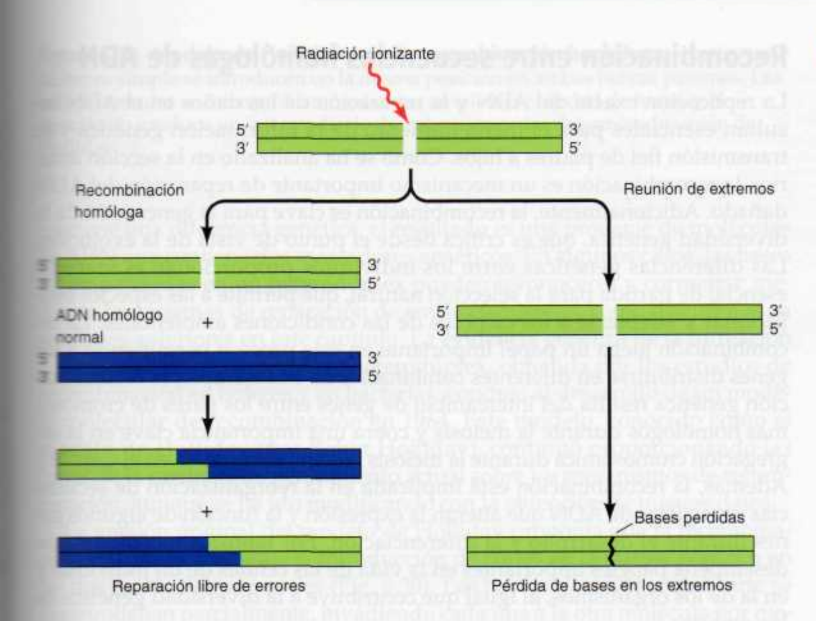


Figura 6.28 Reparación de roturas de doble hebra. La radiación ionizante y algunos agentes químicos inducen roturas de doble hebra en el ADN. Estas roturas pueden ser reparadas por recombinación homóloga con un cromosoma normal, dando lugar a la restauración de la secuencia original de ADN. Por el contrario, los extremos de la molécula rota pueden ser reunidos, con una frecuente pérdida de bases en torno al punto dañado.

Reparación de roturas de doble hebra

Las roturas de doble hebra representan una variante especialmente peligrosa de daños del ADN, ya que la presencia de roturas en ambas hebras del ADN interrumpe la continuidad de dicha molécula (Fig. 6.28). Estas roturas bicatenarias se producen de manera natural en el transcurso de la replicación del ADN, por ejemplo, cuando la ADN polimerasa se topa con una rotura en la hebra molde de ADN en la horquilla de replicación. Por otra parte, la radiación ionizante (como los rayos X) y algunos compuestos químicos que dañan el ADN a través de la creación de roturas en ambas hebras pueden producir roturas de doble hebra.

Las roturas bicatenarias afectan a ambas hebras del ADN, por lo que no son susceptibles de reparación mediante mecanismos basados en la síntesis de ADN en el fragmento dañado. Por ello, la reparación de las roturas de doble hebra tiene lugar a través de un mecanismo especial, la **reparación recombinatoria**, gracias a la cual se unen de nuevo las hebras rotas. Se conocen dos vías principales de reparación recombinatoria (véase Fig. 6.28). La recombinación con secuencias homólogas de ADN de un cromosoma intacto (descrita de forma detallada en la siguiente sección de este capítulo) proporciona un mecanismo de reparación de estas lesiones y permite restablecer la secuencia normal de ADN. En las células eucarióticas, este mecanismo de reparación tan solo actúa tras la replicación del ADN mientras permanecen unidas entre sí las cromátidas hermanas recién sintetizadas (véase Fig. 5.18). Por otra parte, las roturas de doble hebra pueden repararse simplemente mediante la unión de los extremos rotos de una molécula sencilla de ADN, aunque este mecanismo se asocia a una tasa alta de error debido a la deleción de bases en torno al punto dañado. Cabe destacar que uno de los genes responsables del cáncer de mama hereditario (*BRCA2*) codifica una proteína que participa en la reparación de roturas bicatenarias mediante recombinación homóloga, lo que sugiere que las anomalías en esta modalidad de reparación del ADN podrían relacionarse con el desarrollo de uno de los tipos de cáncer más frecuentes en la mujer.

Recombinación entre secuencias homólogas de ADN

La replicación exacta del ADN y la reparación de los daños en el ADN resultan esenciales para el mantenimiento de la información genética y la transmisión fiel de padres a hijos. Como se ha analizado en la sección anterior, la recombinación es un mecanismo importante de reparación del ADN dañado. Adicionalmente, la recombinación es clave para la generación de la diversidad genética, que es crítica desde el punto de vista de la evolución. Las diferencias genéticas entre los individuos proporcionan el material esencial de partida para la selección natural, que permite a las especies evolucionar y adaptarse a los cambios de las condiciones ambientales. La recombinación juega un papel importante en este proceso permitiendo a los genes distribuirse en diferentes combinaciones. Por ejemplo, la recombinación genética resulta del intercambio de genes entre los pares de cromosomas homólogos durante la meiosis y cobra una importancia clave en la segregación cromosómica durante la meiosis I (como se comenta en el Cap. 16). Además, la recombinación está implicada en la reorganización de secuencias específicas de ADN que alteran la expresión y la función de algunos genes durante el desarrollo y la diferenciación. Por tanto, la recombinación desempeña papeles importantes en la vida de las células de un individuo y en la de los organismos, al igual que contribuye a la diversidad genética de las especies.

Esta sección analiza el mecanismo molecular de la **recombinación homóloga**, que implica el intercambio de información entre moléculas de ADN que comparten homología de secuencia a lo largo de cientos de bases. Los ejemplos incluyen la recombinación entre cromosomas emparejados durante la meiosis además de la recombinación homóloga que tiene lugar durante la reparación del ADN. Puesto que esta forma de recombinación implica el intercambio de información genética entre dos moléculas homólogas de ADN, no se altera la organización global de los genes en un cromosoma. Otros tipos de recombinación, sin embargo, no requieren secuencias homólogas extensas y por tanto pueden producirse entre moléculas ADN no relacionadas. Este tipo de recombinación conduce a la reorganización de genes, que se discutirá más tarde en este capítulo.

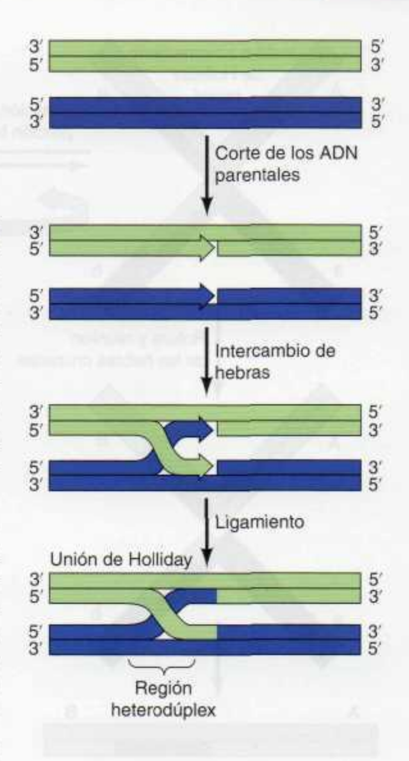
Modelos de recombinación homóloga

La recombinación resulta de la rotura y reunión de dos moléculas de ADN parentales, dando lugar a una reordenación de la información genética de los dos cromosomas parentales. Durante la recombinación homóloga, esto tiene lugar sin ninguna otra alteración de la información genética. Así, una pregunta crítica es: ¿cómo pueden romperse dos moléculas parentales de ADN exactamente en el mismo punto, de manera que se puedan unir sin mutaciones resultantes de la ganancia o pérdida de nucleótidos en el punto de rotura? Durante la recombinación entre moléculas de ADN, este alineamiento se proporciona, como cabe esperar, mediante el apareamiento de bases entre las hebras de ADN complementarias (Fig. 6.29). Entre las moléculas de ADN homólogas se intercambian hebras simples que están empalmadas las unas a las otras, conduciendo a la formación de una región heterodúplex, en la que las dos hebras de la doble hélice recombinante se derivan de diferentes moléculas progenitoras. Si la región heterodúplex

ADN parentales
A B C
5′ 3′
3′ 5′
a b c
5′ 3′
3′ 5′
ADN parentales rotos en sitios no coincidentes
5′ 3′
3′ 5′
5′ 3′
3′ 5′
Unión cruzada vía bases complementarias
Recombinantes
A b c
5′ 3′
3′ 5′
A B c
a B C
5′ 3′
3′ 5′
a b C
Región heterodúplex

Figura 6.29 Recombinación homóloga mediante complementariedad de bases. Los ADN parentales se rompen en sitios no coincidentes, intercambiándose las regiones de hebra simple mediante un apareamiento de bases con las secuencias homólogas. El resultado es una región heterodúplex, en la que las dos hebras de ADN se derivan de moléculas parentales diferentes.

Figura 6.30 Modelo de Holliday para la recombinación homóloga. Los cortes de hebra simple se introducen en la misma posición en ambas hebras paternas. Las hebras cortadas se intercambian mediante complementariedad de bases, y el ligamiento produce un intermediario de hebras cruzadas denominado unión de Holliday.



contiene una diferencia genética, el resultado es una progenie de moléculas de ADN que contiene dos marcadores genéticos. En algunos casos, las bases no emparejadas en un heterodúplex pueden reconocerse y corregirse mediante los sistemas de reparación de emparejamientos, como discutimos en secciones anteriores en este capítulo. La evidencia genética de la formación y reparación de estas regiones heterodúplex, obtenida por los estudios de recombinación en hongos y en bacterias, condujo al desarrollo de un modelo molecular de recombinación en 1964. Este modelo, conocido como el **modelo de Holliday** (por Robin Holliday), continuó proporcionando las bases de la corriente de pensamiento actual sobre los mecanismos de recombinación, aunque se ha ido modificando con la obtención de nuevos datos.

La versión original del modelo de Holliday proponía que la recombinación se iniciaba mediante la introducción de cortes en la misma posición en las dos moléculas parentales (Fig. 6.30). Las hebras de ADN con el corte se desenrollaban parcialmente, invadiendo cada una a la otra molécula por medio de la complementariedad con la hebra sin romper. El ligamiento de las hebras rotas producía un intermediario de hebras cruzadas, conocido como la **unión o intermediario de Holliday**, que es el intermediario central en la recombinación. La demostración directa de la unión de Holliday por microscopia electrónica ha corroborado este modelo de recombinación (Fig. 6.31).

Una vez que el intermediario Holliday se ha formado, se puede resolver cortando y volviendo a unir las hebras cruzadas para producir moléculas recombinantes (Fig. 6.32). Esto puede ocurrir de dos maneras diferentes, dependiendo de la orientación de la unión Holliday, que puede a su vez formar dos isómeros. En el isómero resultante del intercambio de hebras inicial, las hebras cruzadas son aquéllas que se rompieron al inicio del proceso de recombinación. Sin embargo, la simple rotación de esta estructura produce un isómero distinto en el que se cruzan las hebras parentales sin romper. La solución de estos isómeros tiene consecuencias genéticas diferentes. En el primer caso, la progenie de moléculas contiene regiones heterodúplex pero no son recombinantes en el ADN que flanquea esta regiones. Si se da la isomerización, sin embargo, el corte y la unión de las hebras cruzadas dan como resultado una progenie de moléculas que son recombinantes en el ADN que flanquea las regiones heterodúplex. La estructura del intermediario Holliday proporciona por tanto la posibilidad de generar heterodúplex recombinantes y no recombinantes, confirmando los datos genéticos en los que se basaba el modelo de Holliday.

Como se propuso inicialmente, el modelo Holliday no explicaba cómo se iniciaba la recombinación por el corte simultáneo de ambas moléculas parentales en la misma posición. Ahora parece que la recombinación generalmente se inicia en las roturas de doble hebra, tanto durante la reparación del ADN como durante la recombinación entre cromosomas homólogos du-

6.2 Animación web

Recombinación homóloga

En el modelo de Holliday para la recombinación entre dos moléculas de ADN de doble hebra homólogas, el proceso comienza con el corte de una hebra de cada una de las moléculas, seguido de un intercambio de hebra y unión de las hebras cortadas en moléculas opuestas.



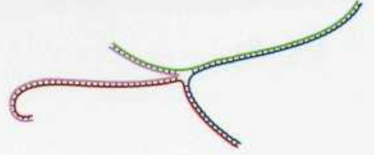


Figura 6.31 Identificación de la unión de Holliday mediante microscopia electrónica. Micrografía electrónica de una unión o intermediario de Holliday que fue detectada durante la recombinación del ADN de plásmidos en *E. coli*. Debajo se muestra una interpretación dibujada de la estructura. La molécula ilustra una unión de Holliday en configuración abierta como resultado de la rotación del intermediario de hebras cruzadas (véase Fig. 6.32). (Cortesía de Huntington Potter, University of South Florida, y David Dressler, University of Oxford).

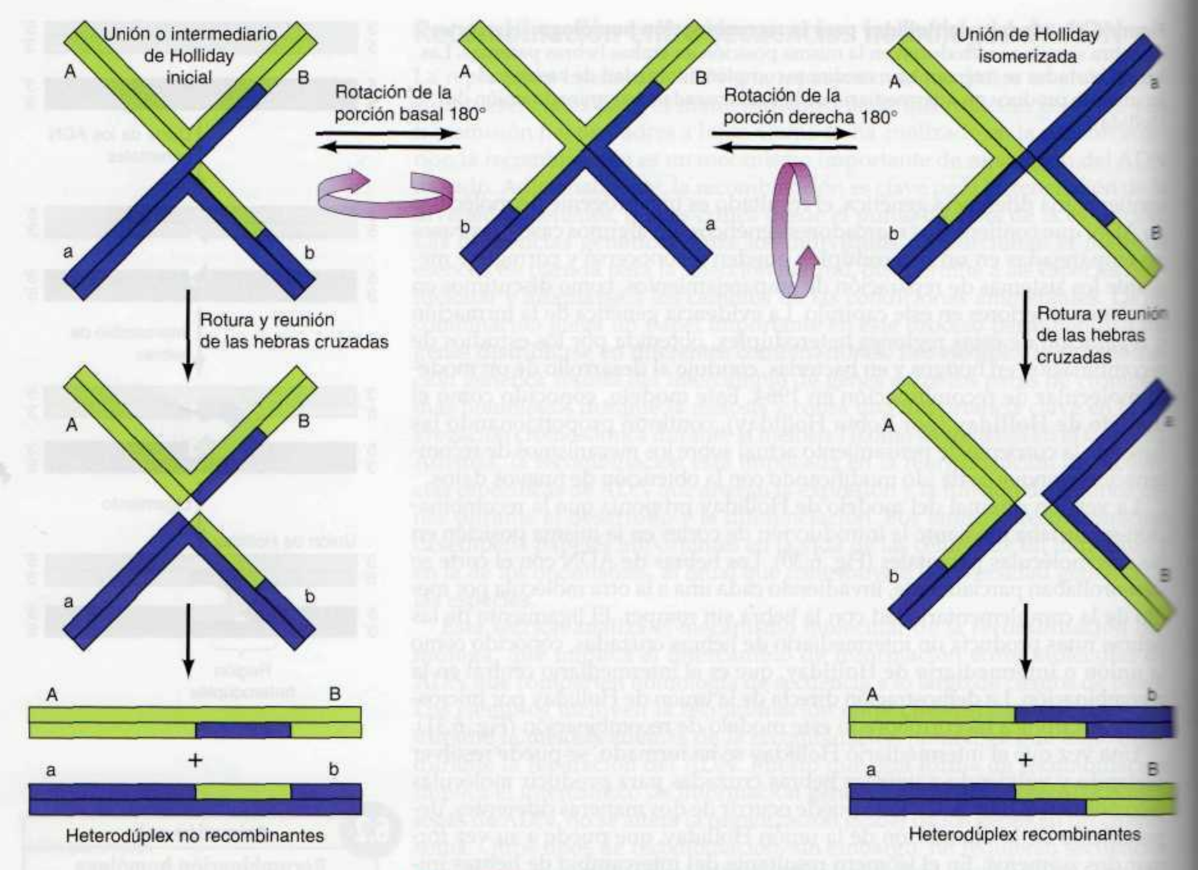


Figura 6.32 Isomerización y resolución de las uniones de Holliday. Las uniones o intermediarios de Holliday se resuelven cortando y uniendo las hebras cruzadas. Si se resuelve la unión Holliday formada por el intercambio inicial de hebras, la progenie resultante son heterodúplex pero no son recombinantes para los marcadores genéticos fuera de la región heterodúplex. Sin embargo, dos rotaciones de la molécula de hebras cruzadas produce un isómero en el que las hebras parentales que no se rompen se cruzan, en lugar de las hebras inicialmente cortadas. El corte y la unión de las hebras cruzadas de este isómero producen una progenie que es heterodúplex recombinante.

rante la meiosis (Fig. 6.33). Ambas hebras de ADN en la rotura de doble hebra son en primer lugar reseccionadas en dirección 5′ a 3′ por parte de nucleasas que digieren el ADN, dando lugar a extremos libres sencillos. Estas hebras sencillas entonces invaden a la otra molécula parental por apareamiento de bases homólogas. A continuación los huecos son rellenados por la síntesis de reparación y las hebras son unidas por ligación para dar lugar a una molécula con una intersección doble de Holliday, la cual puede resolverse para dar lugar a moléculas heterodúplex recombinantes o no recombinantes, como se ha descrito previamente.

Enzimas implicadas en la recombinación homóloga

La mayoría de las enzimas conocidas por participar en la recombinación se han identificado mediante el análisis de mutantes defectivos en la recombinación de *E. coli*. Estos análisis genéticos han establecido que la recombinación requiere enzimas específicas, además de proteínas (como la ADN polimerasa, ligasa y proteínas de unión al ADN de hebra simple) que funcionan

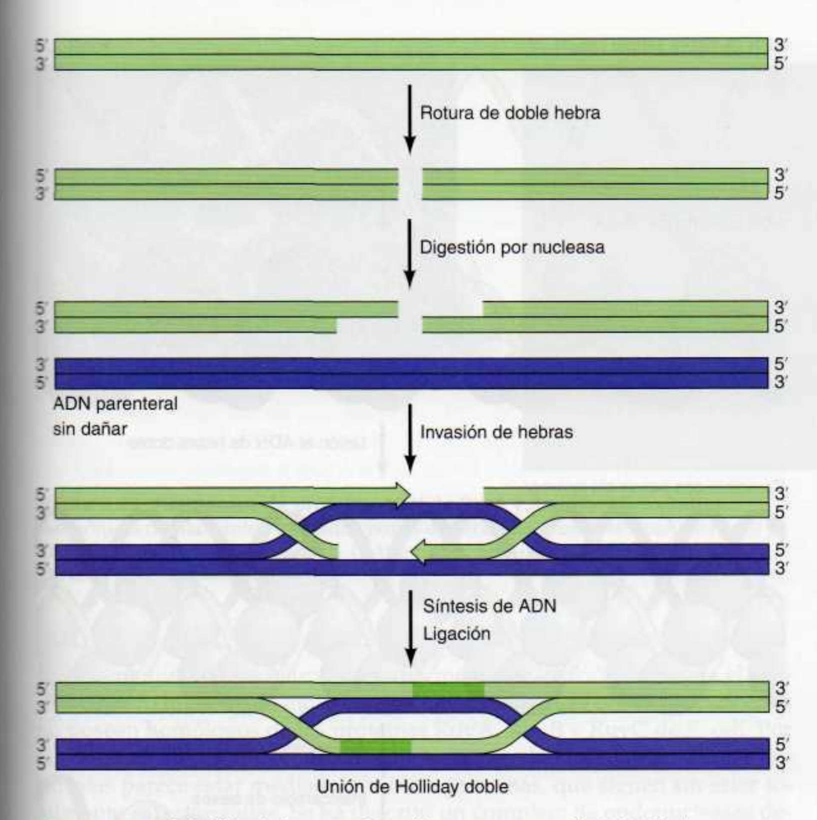


Figura 6.33 *Iniciación de la recombinación por roturas de doble hebra.* Ambas hebras de ADN son digeridas por nucleasas en el punto de rotura de doble hebra en la dirección 5′ a 3′. A continuación, las hebras sencillas invaden la otra molécula parental por apareamiento de bases homólogas. Ahora los huecos son rellenados mediante la síntesis de reparación y sellados mediante ligación, dando lugar a una unión de Holliday doble.

en diversos aspectos del metabolismo del ADN. La identificación de los genes requeridos en una recombinación eficiente en *E. coli* se ha seguido de un progreso considerable en las células eucariotas, dando lugar al aislamiento y caracterización de proteínas que catalizan la formación y resolución de intersecciones de Holliday.

La proteína RecA puede considerarse en tres etapas. En primer lugar, la proteína RecA se une a ADN de hebra sencilla, tapizando el ADN para formar un filamento de proteína-ADN (Fig. 6.34). Puesto que RecA tiene tres sitios de unión al ADN diferentes, la proteína RecA unida al ADN de hebra sencilla es capaz de unirse a una segunda molécula de ADN de doble hebra, formando un complejo entre ambos ADN. Esta asociación inespecífica mediada por RecA está seguida de un apareamiento específico de bases entre la molécula de ADN de hebra sencilla y su complementaria. A continuación, la proteína RecA cataliza el intercambio de cadenas, con la hebra sencilla originalmente tapizada con RecA desplazando a su hebra homóloga para formar un heterodúplex.

En las células eucarióticas, dos proteínas estrechamente relacionadas, Rad51 y Dmc1, actúan de forma similar a RecA. Rad51 se expresa de manera continua, mientras que Dmc1 tan solo lo hace durante la meiosis. Ambas proteínas se unen al ADN de hebra sencilla para formar filamentos de

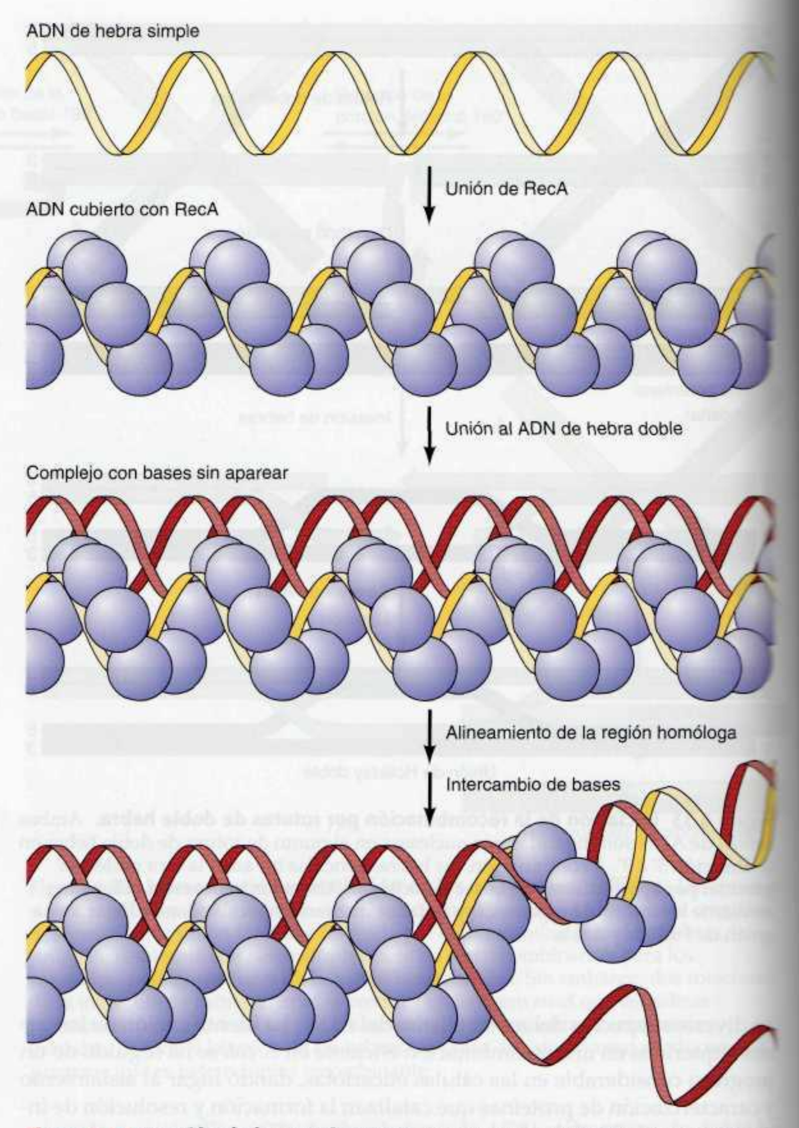
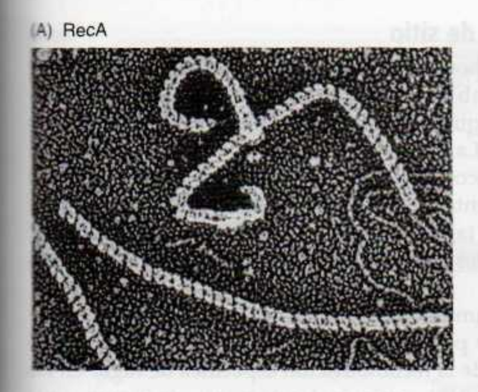


Figura 6.34 Función de la proteína RecA. RecA se une inicialmente a un ADN de hebra simple para formar un filamento de ADN-proteína. La proteína RecA que envuelve al ADN de hebra simple se une a una segunda molécula de ADN de doble hebra para formar un complejo sin apareamiento de bases. Seguidamente se produce la complementariedad de bases y el intercambio de hebras, formando una región heterodúplex.

ADN-proteína semejantes a los creados por RecA (Fig. 6.35) y también pueden catalizar las reacciones de intercambio de hebras *in vitro.*

En *E. coli*, las intersecciones de Holliday se resuelven mediante un complejo de tres proteínas, RuvA, RuvB y RuvC (Fig. 6.36). RuvA reconoce a la intersección de Holliday y recluta a RuvB, que actúa como un motor que dirige la migración del punto en el que se cruzan las hebras de ADN, variando así la extensión de la región del heterodúplex y la posición en la que las hebras cruzadas serán cortas y estarían reunidas. RuvC ahora resuelve las intersecciones de Holliday cortando las hebras de ADN cruza-



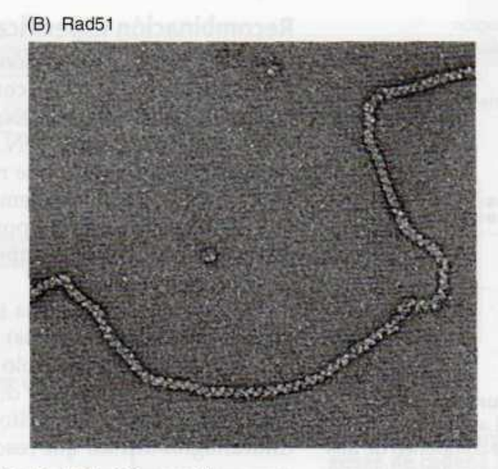


Figura 6.35 Filamentos de proteína ADN de RecA y Rad51. Micrografías electrónicas de filamentos formados por la unión de las proteínas RecA de *E. coli* y Rad51 de humanos al ADN. (De S. C. West 2003. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4:1. Cortesía de A. Stasiak y S. West.)

das. La reunión de las hebras cortadas mediante ligación completa el proceso, dando lugar a dos moléculas recombinantes. Las células eucarióticas no poseen homólogos de las proteínas RuvA, RuvB y RuvC de *E. coli*. Por el contrario, la resolución de las intersecciones de Holliday en células eucariotas parece estar mediada por otras proteínas, que siguen sin estar totalmente caracterizadas. Se ha descrito un complejo de endonucleasas denominado Mus81-Eme1 que podría actuar como resolvasa de la intersección de Holliday en las células eucarióticas, aunque aún no se conoce bien su funcionamiento.

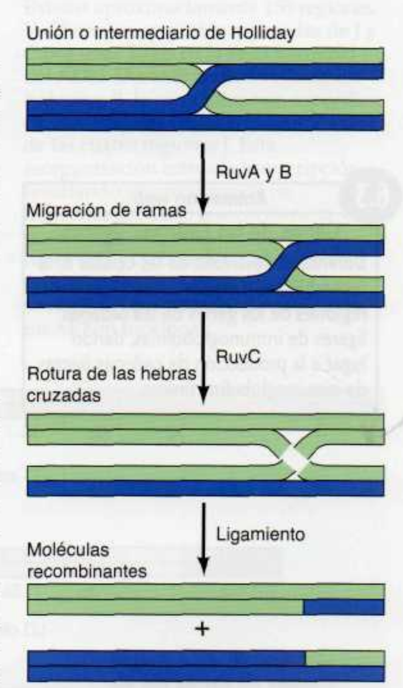


Figura 6.36 Migración de ramas y resolución de las uniones o intermediarios de Holliday. Dos proteínas de *E. coli* (RuvA y RuvB) catalizan el movimiento del punto donde las hebras se cruzan en las uniones de Holliday (migración de ramas). RuvC resuelve las uniones de Holliday rompiendo las hebras cruzadas, que son unidas por una ligasa.

Reorganización del ADN

La recombinación homóloga da lugar a la reorganización de genes entre pares de cromosomas sin alterar la disposición de los genes en el genoma. Por el contrario, otros procesos recombinatorios conducen a la reorganización del ADN genómico. Algunas de estas organizaciones del ADN son importantes para el control de la expresión génica en determinados tipos de células; otros pueden desempeñar un papel evolutivo al contribuir con la diversidad genética.

El descubrimiento de que los genes son capaces de moverse a diferentes localizaciones surgió a raíz de los estudios de Barbara McClintock con maíz en los años cuarenta. Basada estrictamente en análisis genéticos, McClintock describió nuevos elementos genéticos que podían moverse a distintas localizaciones en el genoma y que alteraban la expresión de los genes adyacentes. Sin embargo, tuvieron que pasar cerca de tres décadas después del descubrimiento de McClintock hasta que la mayoría de los científicos aceptaran el descubrimiento de elementos transposables en bacterias y la noción de elementos genéticos móviles. Actualmente se reconocen diversos tipos de reorganizaciones del ADN, incluyendo la transposición de los elementos inicialmente descrita por McClintock, en las células procariotas y eucariotas. Es más, en la actualidad se sabe que los elementos transponibles constituyen una gran fracción de los genomas de animales y plantas, incluyendo casi la mitad del genoma humano.

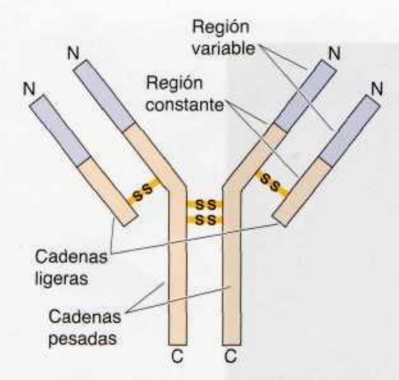


Figura 6.37 Estructura de una inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas se componen de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, unidas por puentes disulfuro. Las cadenas pesadas y ligeras presentan regiones variables y constantes.

Recombinación específica de sitio

Contraria a la recombinación homóloga, que ocurre en cualquier región de secuencia homóloga, la **recombinación específica de sitio** se da entre secuencias específicas de ADN, que normalmente son homólogas en tan solo una franja estrecha de ADN. La interacción principal en este proceso está mediada por proteínas que reconocen las secuencias específicas diana del ADN en lugar de la complementariedad de bases. La recombinación específica de lugar da ocasión, por tanto, a reordenamientos programados del ADN que pueden jugar papeles importantes en el desarrollo y regulación de la expresión génica.

El desarrollo del sistema inmune de vertebrados, que reconoce las sustancias extrañas **(antígenos)** y proporciona protección frente a agentes infecciosos, es un gran ejemplo de la recombinación específica de lugar en los eucariotas superiores. Hay dos clases principales de respuesta inmune, que están mediadas por linfocitos B y T. Los linfocitos B secretan anticuerpos **(inmunoglobulinas)** que reaccionan con antígenos solubles; los linfocitos T expresan proteínas de superficie celular (denominadas **receptores de células T**) que reaccionan con antígenos expresados en la superficie de otras células. La característica clave tanto de las inmunoglobulinas y de los receptores de células T es su enorme diversidad, que permite que diferentes anticuerpos o moléculas receptoras de células T reconozcan una amplia gama de antígenos extraños. Por ejemplo, cada individuo es capaz de producir más de 10^{11} moléculas de anticuerpo diferentes, que excede con creces el número total de genes presentes en los genomas de mamíferos (20.000-25.000). En lugar de estar codificados en el DN germinal, estos diversos anticuerpos (y receptores de células T) están codificados por el sistema inmune como resultado de una recombinación específica de lugar entre distintos segmentos de los genes de inmunoglobulinas y receptores de células T.

El papel de la recombinación de sitio específico en la formación de los genes de las inmunoglobulinas lo demostró por primera vez Susumu Tonegawa en 1976. Las inmunoglobulinas consisten en pares de cadenas de nucleótidos pesadas y ligeras idénticas (Fig. 6.37). Las cadenas pesadas y ligeras se componen de regiones C-terminal constantes y regiones N-terminal variables. Las regiones variables, que contienen diferentes secuencias de aminoácidos en diferentes moléculas de inmunoglobulinas, son las responsables de la unión con el antígeno, y es la diversidad de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables las que permiten a los anticuerpos de un individuo reconocer a antígenos únicos. Aunque cada individuo es capaz de producir un vasto espectro de anticuerpos distintos, cada linfocito B produce un solo tipo de anticuerpo. El descubrimiento clave de Tonegawa fue que cada anticuerpo está codificado por genes únicos formados por recombinación específica de sitio durante el desarrollo de los linfocitos B. Estas reorganizaciones genéticas crean diferentes genes de inmunoglobulinas en los diferentes linfocitos B del individuo, de manera que la población aproximada de 10^{12} linfocitos B en el cuerpo humano incluye células capaces de producir anticuerpos en contra de una gran diversidad de antígenos.

Los genes que codifican las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas constan de tres regiones: una región V que codifica entre 95 y 96 aminoácidos N-terminales de la región polipeptídica variable; una región de unión (J) que codifica entre 12 y 14 aminoácidos C-terminales de la región polipeptídica variable; y una región C que codifica a la región polipeptídica constante (Fig. 6.38). La clase principal de genes que codifican la cadena ligera en el ratón se forman por la combinación de aproximadamente 150 regiones V y cuatro regiones J con una sola región C. La recombinación específica de sitio durante el desarrollo de los linfocitos conduce a la reorganización del gen en la que una sola región V se recombina con una sola región

6.3 Animación web

Genes de las cadenas ligeras

Durante el desarrollo de las células B, la recombinación específica de lugar une regiones de los genes de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas, dando lugar a la producción de cadenas ligeras de inmunoglobulina únicas.

6.4 Animación web

Genes de las cadenas pesadas

Durante el desarrollo de las células B, la recombinación específica de lugar une regiones de los genes de las cadenas pesadas de inmunoglobulina, dando lugar a la producción de cadenas pesadas de inmunoglobulina únicas.

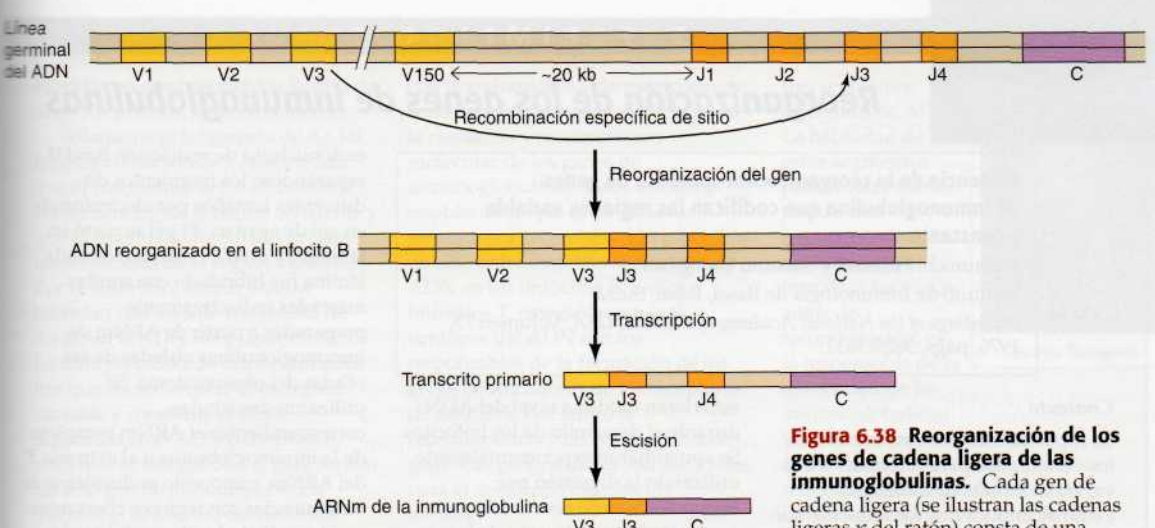


Figura 6.38 Reorganización de los genes de cadena ligera de las inmunoglobulinas. Cada gen de cadena ligera (se ilustran las cadenas ligeras κ del ratón) consta de una región constante (C), una región de unión (J) y de una región variable (V). Existen aproximadamente 150 regiones V diferentes, que están separadas de J y C por unas 20 kb en la línea germinal del ADN. Durante el desarrollo de los linfocitos B, la recombinación específica de sitio une una de las regiones V a una de las cuatro regiones J. Esta reorganización activa la transcripción, resultando la formación de un transcrito primario que contiene la región organizada VJ junto con las regiones J y C restantes. Las regiones J no utilizadas y los intrones entre J y C se eliminan por escisión, produciendo un ARNm funcional.

J para generar un gen de cadena ligera funcional. Diferentes regiones V y J se reorganizan en diferentes linfocitos B, de modo que las combinaciones posibles de 150 regiones V con 4 regiones J pueden generar aproximadamente 600 (4 × 150) cadenas ligeras únicas.

Los genes de las cadenas pesadas incluyen una cuarta región (conocida como la de diversidad, o región D), que codifica los aminoácidos situados entre las regiones V y J (Fig. 6.39). El ensamblaje del gen funcional de la cadena pesada requiere dos procesos de recombinación: Una región D se recombina con una región J, y después una región V se recombina con el segmento recombinado DJ. En el ratón, existen alrededor de 150 regiones V de cadena pesada, 12 regiones D, y 4 regiones J, por lo que el número total de

Línea germinal del ADN
D10 D12
V1 V150 D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8 D9 D11 J1 J2 J3 J4 C
Unión de los segmentos D y J
V1 V150 D1 D2 D3 D4 D5 J2 J3 J4 C
Unión de V al segmento DJ
ADN organizado en el linfocito B
V1 V25 D5 J2 J3 J4 C
Transcripción
Transcrito primario
V25 D5 J2 J3 J4 C
Escisión
ARNm
V25 D5 J2 C

Figura 6.39 Reorganización de los genes de cadena pesada de las inmunoglobulinas. Los genes de la cadena pesada contienen regiones D además de regiones V, J y C. Primero se unen los segmentos D y J. Después se une un segmento V a la región ya organizada DJ. Los intrones entre J y C se eliminan por escisión para dar el ARNm de la cadena pesada.



EXPERIMENTO CLAVE

Reorganización de los genes de inmunoglobulinas

Evidencia de la reorganización somática de genes de inmunoglobulina que codifican las regiones variable y constante

Nobumichi Hozumi y Susumu Tonegawa
Instituto de Inmunología de Basel, Basel, Suiza

Procedings of the National Academy of Sciences, USA, Volumen 73, 1976, págs. 3628-3632

Contexto

La capacidad del sistema inmune de los vertebrados para reconocer a una variedad infinita de moléculas extrañas implica que los linfocitos son capaces de producir la correspondiente vasta diversidad de anticuerpos. Ya que esta diversidad de anticuerpos es la clave del reconocimiento inmune, comprender el mecanismo mediante el cual aparentemente se codifica un número ilimitado de diferentes inmunoglobulinas en el ADN genómico es uno de los principales temas que trata la inmunología.

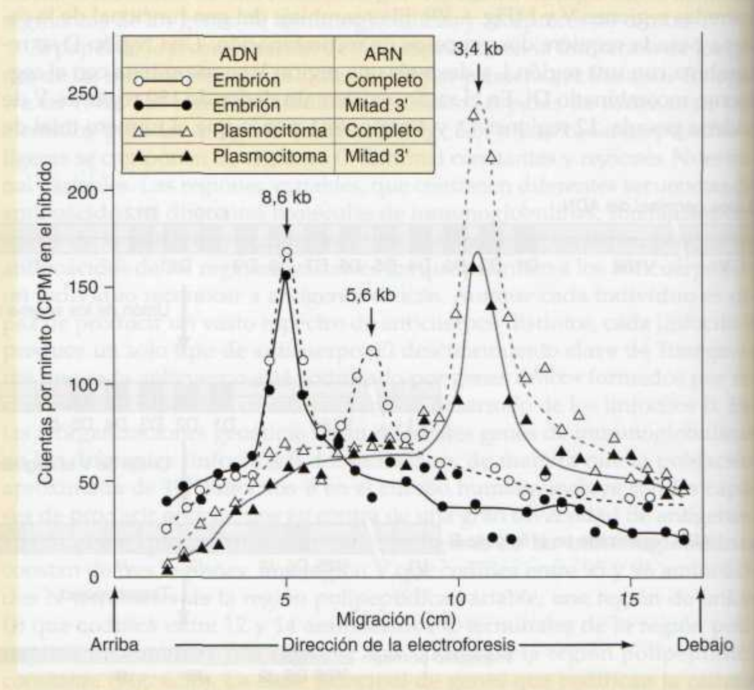
Previamente a los experimentos de Hozumi y Tonegawa, la secuenciación de proteínas de varias inmunoglobulinas había demostrado que las cadenas ligeras y pesadas se componían de distintas regiones variables y constantes. Estudios genéticos posteriores indicaron que los ratones solo heredaban copias simples de los genes de la región constante. Estas observaciones condujeron a proponer que las inmunoglobulinas están codificadas por múltiples genes de regiones variables que pueden asociarse con un gen de región constante. El descubrimiento de las reorganizaciones genéticas de las inmunoglobulinas por Hozumi y Tonegawa proporcionó la primera base experimental para esta hipótesis y supuso el inicio del entendimiento de la base molecular de la diversidad de anticuerpos.

Experimentos

Hozumi y Tonegawa probaron la posibilidad de que los genes que codifican las regiones variable y constante de las inmunoglobulinas estuvieran unidos a nivel del ADN durante el desarrollo de los linfocitos. Se aproximaron experimentalmente utilizando la digestión por endonucleasas de restricción para comparar la organización de las secuencias de las regiones variable y constante en ADN extraídos de embriones de ratón y de células de un plasmocitoma de ratón (un tumor de linfocitos B que produce una sola especie de inmunoglobulinas).

Los ADN del embrión y el plasmocitoma fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *Bam*HI, separándose los fragmentos de diferentes tamaños por electroforesis en gel de agarosa. El gel se cortó en láminas, y el ADN extraído de cada lámina fue hibridado con sondas marcadas radiactivamente preparadas a partir de ARNm de inmunoglobulinas aisladas de las células del plasmocitoma. Se utilizaron dos sondas, correspondientes al ARNm completo de la inmunoglobulina o al extremo 3' del ARNm, compuesto exclusivamente de secuencias con regiones constantes.

El resultado fundamental fue la obtención de patrones completamente distintos para las secuencias de las regiones variables y las regiones constantes detectadas en el ADN del embrión en comparación con los encontrados en el ADN del plasmocitoma (véase figura). En el ADN del embrión, la sonda completa



Gel de electroforesis de los ADN de embrión y plasmocitoma digeridos con *BamHI* e hibridados con sondas correspondientes al ARNm completo o a la parte 3' del ARNm del plasmocitoma. Los datos están representados tal y como se detectó la radioactividad en las moléculas híbridas con ADN en cada porción de gel.

EXPERIMENTO CLAVE

hibrida con dos fragmentos *Bam*HI de unas 8,6 y 5,6 kb, respectivamente.

Solamente el fragmento de 8,6 kb hibrida con la sonda 3', sugiriendo que el fragmento de 8,6 kb contiene las secuencias de la región constante y que el fragmento de 5,6 kb contiene las secuencias de la región variable. Por el contrario, ambas sondas hibridan con un solo fragmento de 3,4 kb en el ADN del plasmocitoma. La interpretación de estos resultados fue que las secuencias de la región variable y constante estaban separadas en el ADN del embrión pero que se reorganizaron para formar un solo gen de inmunoglobulina durante el desarrollo del linfocito.

Impacto

Los resultados iniciales de Hozumi y Tonegawa, basados en los datos relativamente indirectos del mapeo con la endonucleasa de restricción, se confirmaron y ampliaron a través de la clonación y secuenciación molecular de los genes de inmunoglobulinas. Estos estudios establecieron que estos genes se generan por recombinación específica de sitio entre distintos segmentos de ADN en los linfocitos B. En los linfocitos T, reorganizamientos similares del ADN son los responsables de la formación de los genes codificadores de los receptores de células T. Por tanto, la recombinación y las reorganizacones genéticas programadas son esenciales para el desarrollo del sistema inmune.

Estudios posteriores han demostrado que las regiones variables de las inmunoglobulinas y los receptores de células T se generan mediante reorganizaciones de dos o tres segmentos diferentes de ADN. La habilidad de estos segmentos para recombinarse, junto a una frecuencia elevada de mutaciones introducidas en los sitios de recombinación, es la responsable de la diversidad de las inmunoglobulinas y los receptores de células T. El descubrimiento de las reorganizaciones genéticas de las inmunoglobulinas proporcionó las bases para llegar a entender cómo el sistema inmune puede reconocer y responder a una variedad virtualmente ilimitada de sustancias ajenas.

Susumu Tonegawa

cadenas pesadas que se pueden generar mediante los procesos de recombinación es alrededor de 7.200 ($150 \times 12 \times 4$).

Las combinaciones entre las 600 cadenas ligeras diferentes y las 7.200 cadenas pesadas diferentes que se han formado por recombinación específica de sitio pueden generar aproximadamente 4×10^6 moléculas de inmunoglobulina diferentes. Esta diversidad aumenta aún más debido a que las uniones entre los segmentos genéticos de las inmunoglobulinas a menudo implican la pérdida o ganancia desde uno hasta varios nucleótidos, como se comenta más adelante. Las mutaciones que resultan de estas deleciones e inserciones incrementan la diversidad de las regiones variables de las inmunoglobulinas más de 100 veces, correspondiendo con la formación de unas 10^5 cadenas ligeras diferentes y 10^6 cadenas pesadas, que pueden combinarse después para formar aproximadamente 10^{11} anticuerpos distintos.

Los receptores de las células T de forma similar se componen de dos cadenas (llamadas α y β), cada una de ellas presentando regiones variables y constantes (Fig. 6.40). Los genes que codifican estos polipéptidos se generan por la recombinación entre los segmentos V y J (la cadena α) o entre los segmentos V, D y J (la cadena β), análogamente a la formación de los genes de las inmunoglobulinas. La recombinación específica de sitio entre los distintos segmentos de ADN, en combinación con las mutaciones introducidas durante la recombinación, genera un grado de diversidad de los receptores de células T similar al de las inmunoglobulinas.

La recombinación V(D)J está mediada por un complejo de dos proteínas, denominadas RAG1 y RAG2, que se expresan específicamente en linfocitos. Las proteínas RAG reconocen las secuencias señal de recombinación (RS) adyacentes a las secuencias codificadoras de cada segmento, e inician las reorganizaciones de ADN introduciendo una rotura de doble hebra entre las secuencias RS y las secuencias codificantes (Fig. 6.41). A continuación, se unen los extremos codificantes de los segmentos génicos para dar lugar a un gen reorganizado de inmunoglobulina o receptor de células T. Ya que es-

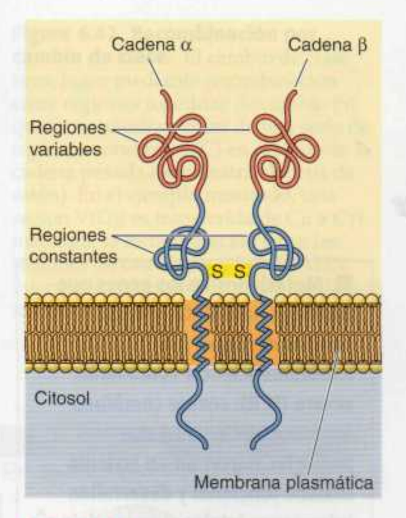


Figura 6.40 Estructura de un receptor de células T. Los receptores de células T se componen de dos cadenas polipeptídicas (α y β) que atraviesan la membrana plasmática y que están unidas por puentes disulfuro. Las cadenas α y β se componen de regiones variables y constantes.

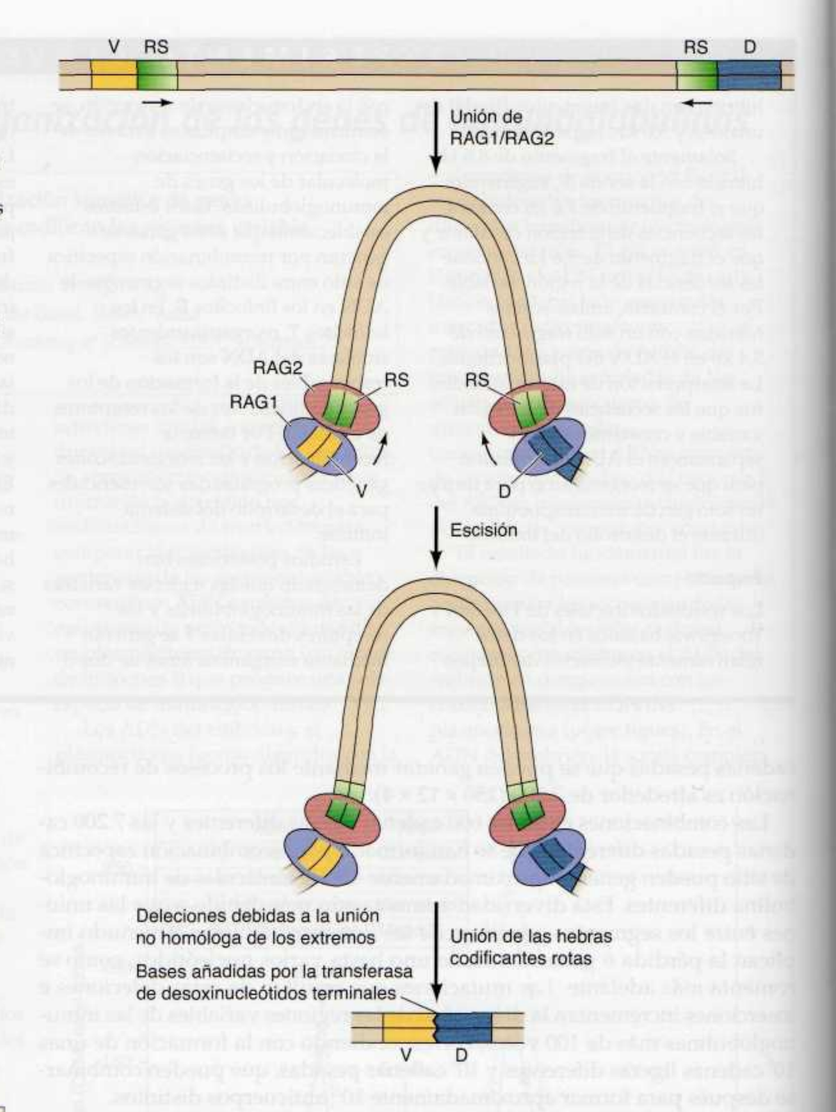


Figura 6.41 Recombinación V(D)J. Los segmentos codificadores de los genes de las inmunoglobulinas y los receptores de células T (p. ej., un segmento V y D) están flanqueados por secuencias señal de recombinación cortas (RS), opuestamente orientadas en los extremos 5′ y 3′ de las secuencias codificadoras. Las RS son reconocidas por un complejo de proteínas de recombinación específica de linfocitos RAG1 y RAG2, que rompen el ADN entre las secuencias codificadoras y las RS. Las hebras codificadoras rotas se unen para producir un segmento del gen reorganizado. Las mutaciones resultan de la pérdida de bases en los extremos durante la unión no homóloga de los extremos, además de la adición de bases por parte de la desoxinucleotidil transferasa.

■ **Mutaciones en los genes que codifican para RAG1 y RAG2 pueden dar lugar a la inmunodeficiencia combinada severa (SCID: *severe combined immunodeficiency*). Estos pacientes nacen sin un sistema inmune funcional y desarrollan infecciones letales si se les deja sin tratamiento. Los tratamientos incluyen vivir en un ambiente libre de gérmenes (en «burbujas» de plástico), trasplante con células madre que dan lugar a un sistema inmune funcional, y terapia génica.**

tas roturas de doble hebra son unidas mediante un proceso de unión de extremos no homólogo (véase Fig. 6.28), la reacción de unión es acompañada de una frecuente pérdida de nucleótidos. Adicionalmente, los linfocitos contienen una enzima especializada (desoxinucleotidil transferasa terminal) que añade nucleótidos al azar a los extremos de las moléculas de ADN, de modo que las mutaciones correspondientes tanto a la pérdida como a la ganancia de nucleótidos son introducidos durante la reacción de unión. Como se ha indicado anteriormente, estas mutaciones contribuyen sustancialmente a la diversidad de las inmunoglobulinas y receptores de células T.

Se genera incluso más diversidad de anticuerpos tras la formación de genes de inmunoglobulina reordenados mediante dos procesos que tienen lugar sólo en los linfocitos B: la recombinación de cambio de clase y la hipermutación somática. La **recombinación de cambio de clase** resulta en la asociación de regiones reordenadas V(D)J con diferentes regiones constantes de cadenas pesadas, generando la producción de anticuerpos con distintos papeles funcionales en la respuesta inmune. Los mamíferos producen cuatro clases diferentes de imunoglobulinas —IgM, IgG, IgE e IgA— con

cadenas pesadas codificadas por una región variable unida a las regiones constantes Cμ, Cγ, Cε y Cα, respectivamente. Adicionalmente, hay varias subclases de IgG, que están codificadas por distintas regiones Cγ. Las diferentes clases de inmunoglobulinas están especializadas para eliminar antígenos de diferentes formas. La IgM activa el complemento (un grupo de proteínas séricas que destruyen las células invasoras y los virus), de modo que los anticuerpos IgM son una primera línea de defensa efectiva frente a infecciones bacterianas o víricas. Los anticuerpos IgG, las inmunoglobulinas más abundantes en suero, no sólo activan el complemento sino que también se unen a receptores presentes en la superficie de células fagocíticas. Adicionalmente, los anticuerpos IgG pueden cruzar la placenta desde la circulación materna, proporcionando protección inmunológica al feto. Los anticuerpos IgA son secretados en una diversidad de fluidos corporales, como el moco nasal y la saliva, donde pueden unirse y eliminar bacterias invasoras o virus para prevenir una infección. Los anticuerpos IgA también son secretados en la leche materna, de modo que proporcionan protección inmunológica a los recién nacidos. Los anticuerpos IgE son efectivos en la protección frente a infecciones parasíticas, y también son la clase de anticuerpos responsables de las alergias.

El reordenamiento V(D)J inicial produce una región variable unida a Cμ, resultando en la producción de anticuerpos IgM. La recombinación de cambio de clase a continuación transfiere una región variable reordenada a una nueva región constante, con la deleción del ADN intermedio (Fig. 6.42). La recombinación tiene lugar entre las secuencias altamente repetidas en las regiones de cambio (S: *switch region*) que se localizan inmediatamente antes de cada región C. Las regiones de cambio son de 2-10 kb de largo y la recombinación puede tener lugar en cualquier parte de estas regiones, de modo que el cambio de clase es descrito de forma más correcta como un evento específico de región en lugar de específico de lugar. Puesto que las regiones de cambio se encuentran dentro de intrones, el punto preciso en que se produce la recombinación de cambio de clase no afecta a la secuencia codificadora de la inmunoglobulina.

La **hipermutación somática** incrementa la diversidad de inmunoglobulinas produciendo múltiples mutaciones dentro de las regiones variables reordenadas tanto de las cadenas ligeras como de las cadenas pesadas. Estas mutaciones, principalmente sustituciones de una sola base, tienen lugar con frecuencias tan elevadas como 10^{-3}, aproximadamente un millón de veces más que las tasas normales de mutación espontánea. Dan lugar a la producción de inmunoglobulinas con una afinidad por el antígeno sustancialmente incrementada, y por tanto, son una contribución importante para una respuesta inmune efectiva.

La recombinación de cambio de clase y la hipermutación somática son tipos nuevos de alteraciones genéticas programadas, y los mecanismos moleculares implicados son áreas de investigación muy activa. Un jugador clave en ambos procesos es la enzima denominada **deaminasa inducida por activación (AID: *activation-induced deaminase*)**, que fue descubierta por Tasuku Honjo y sus colaboradores en 1999. AID se expresa solamente en linfocitos B, y es necesaria tanto para la recombinación de cambio de clase, como para la hiper-

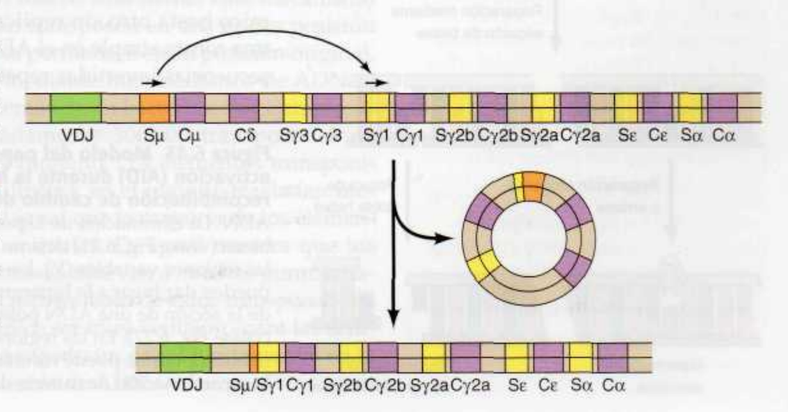


Figura 6.42 Recombinación por cambio de clase. El cambio de clase tiene lugar mediante recombinación entre regiones repetidas de cambio (S) que se encuentran antes de una serie de regiones constantes (C) en el locus de la cadena pesada (se muestra el locus de ratón). En el ejemplo mostrado, una región V(D)J es transferida de Cμ a Cγ1 mediante la recombinación entre las regiones de cambio Sμ y Sγ1. El ADN intermedio es escindido en forma de una molécula circular.

mutación somática. AID cataliza la deaminación de citosina en ADN para formar uracilo (Fig. 6.43). Esta acción resulta en la conversión de C → U en las regiones variables y regiones de cambio de los genes de inmunoglobulina, dando lugar a la recombinación de cambio de clase y a la hipermutación somática, respectivamente. Los mecanismos por los que las mutaciones C → U estimulan estos procesos no se comprenden por completo, pero un paso importante parece ser la eliminación de U mediante reparación por escisión de bases (véase Fig. 6.21). En las regiones de cambio (que tienen un mayor contenido de pares de bases GC) se forman roturas de doble hebra como consecuencia de la eliminación de roturas de los residuos de uracilo en las hebras opuestas. A continuación, tiene lugar un proceso de recombinación de cambio de clase debido a la reparación de estas roturas en distintas regiones de cambio mediante la unión de extremos no homólogos (véase Fig. 6.28). En las regiones variables, se cree que la hipermutación somática podría deberse a la elevada tasa de errores durante la reparación de mutaciones C → U, posiblemente como consecuencia de la reparación efectuada por ADN polimerasas especializadas propensas a errores (véase Fig. 6.27). A pesar de que los detalles de estos procesos sigan sin dilucidarse, resulta evidente que AID es una enzima muy interesante con el novedoso papel de introducir mutaciones en el ADN en estadios específicos del desarrollo.

Transposición vía intermediarios de ADN

La recombinación específica de sitio ocurre entre dos secuencias específicas que contienen al menos un pequeño centro homólogo. Por el contrario, la transposición implica el movimiento de secuencias a través del genoma y no requiere secuencias homólogas. Los elementos que se mueven por transposición, como aquellos que describió por primera vez McClintock, se denominan **elementos transponibles**, o **transposones**. Se dividen en dos clases generales, dependiendo de si se transponen mediante un intermediario de ADN o por un intermediario de ARN. La primera clase de elementos transponibles se discute aquí; la transposición a través de intermediarios de ARN se considera en la próxima sección.

Los transposones mejor conocidos hasta ahora son los de las bacterias, moviéndose todos ellos por medio de intermediarios de ADN (Fig. 6.44). Los elementos más simples son las secuencias de inserción (SI), con una variedad de tamaño entre los 800 y los 2.000 nucleótidos. Las secuencias de inserción se componen solamente del gen de la enzima que participa en la transposición (transposasa) flanqueada por repeticiones invertidas cortas, que son los sitios donde actúa la transposasa.

Las secuencias de inserción se mueven desde un sitio cromosómico hasta otro sin replicar su ADN. La transposasa introduce una rotura simple en el ADN diana y corta en los extremos de las secuencias invertidas repetidas del transposón. Aunque la trans-

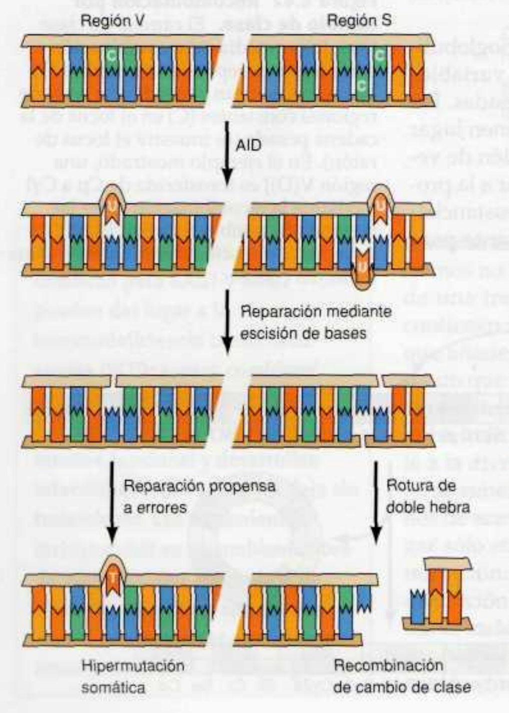


Figura 6.43 Modelo del papel de la deaminasa inducida por activación (AID) durante la hipermutación somática y la recombinación de cambio de clase. AID deamina a C para dar U en el ADN. La eliminación de U por parte de la reparación por escisión de bases (véase Fig. 6.21) deja un hueco de una sola hebra en el ADN. En las regiones variables (V), los errores producidos durante la reparación pueden dar lugar a la hipermutación somática, posiblemente resultando de la acción de una ADN polimerasa propensa a errores especializada (véase Fig. 6.27). En las regiones de cambio (S), la escisión de bases de hebras opuestas puede resultar en roturas de doble hebra que estimulan la recombinación de cambio de clase.

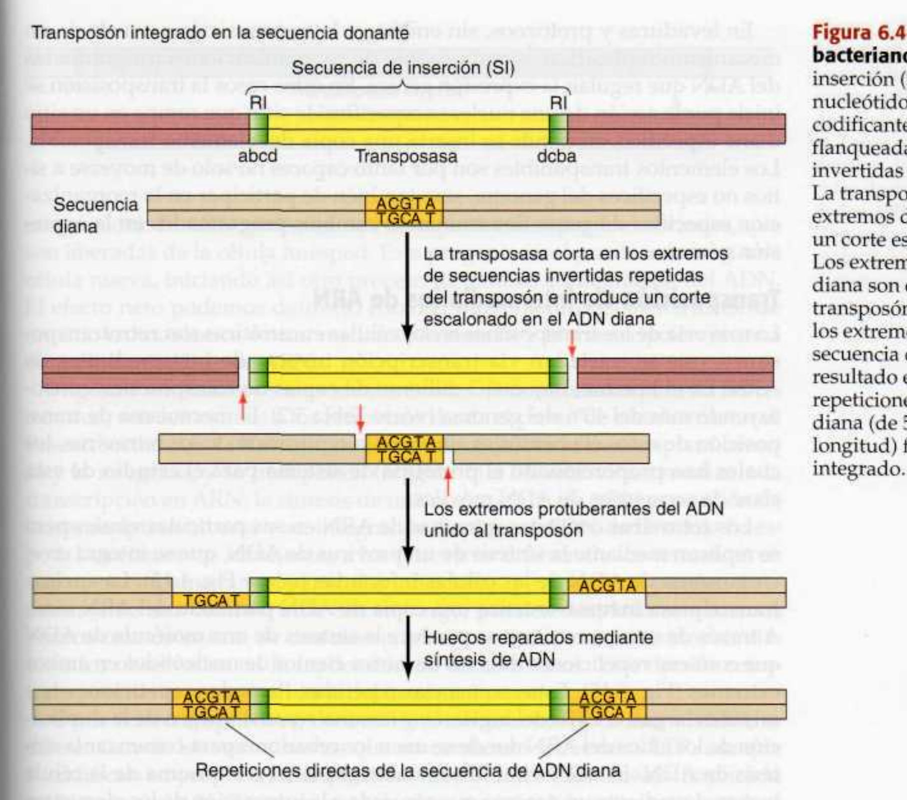


Figura 6.44 Transposones bacterianos. Las secuencias de inserción (SI) varían entre 800 y 2.000 nucleótidos y contienen un gen codificante de la transposasa flanqueada por secuencias repetidas invertidas (RI) de unos 20 nucleótidos. La transposasa escinde ambos extremos del transposón e introduce un corte escalonado en el ADN diana. Los extremos protuberantes del ADN diana son entonces unidos al transposón, y los huecos resultantes de los extremos protuberantes en la secuencia diana se reparan. El resultado es la formación de repeticiones directas y cortas del ADN diana (de 5 a 10 nucleótidos de longitud) flanqueando al transposón integrado.

posasa actúa específicamente en las repeticiones invertidas del transposón, normalmente es menos específica respecto a la secuencia del ADN diana, de manera que cataliza el movimiento del transposón a lo largo del genoma. Tras el corte del transposón y de los sitios diana del ADN, la transposasa une los extremos que cuelgan del ADN diana al elemento transponible. El espacio resultante en el ADN diana se repara mediante la síntesis de ADN, seguida por el ligamiento a la otra hebra del transposón. El resultado de este proceso es una repetición directa corta del sitio diana del ADN a ambos lados del elemento transponible —una marca de la integración del transposón.

Este mecanismo de transposición determina el movimiento del transposón desde un sitio cromosómico a otro. Otros tipos de transposones se mueven mediante un mecanismo más complejo, en el que el transposón se replica de acuerdo con su integración en el nuevo sitio diana. Este mecanismo produce la integración de una copia del transposón en una nueva posición en el genoma, mientras que la otra copia permanece en su posición original.

Los transposones que se trasladan mediante intermediarios de ADN se encuentran presentes en eucariotas además de en bacterias. Por ejemplo, el genoma humano contiene aproximadamente 300.000 transposones de ADN, que constituyen el 3% del ADN humano. Los elementos transponibles originalmente descritos por McClintock en el maíz se trasladan mediante un mecanismo no replicativo, al igual que la mayoría de los elementos transponibles de otras plantas y animales. De igual manera que los transposones bacterianos, estos elementos se mueven a muchos puntos diana diferentes a lo largo del genoma. El movimiento de estos transposones a sitios no específicos del genoma no parece ser muy ventajoso para las células en las que ocurre, pero sin duda ha jugado un papel fundamental en la evolución estimulando las reorganizaciones de ADN.

En levaduras y protozoos, sin embargo, la transposición a través de un mecanismo replicativo es responsable de reorganizaciones programadas del ADN que regulan la expresión génica. En estos casos la transposición se inicia por la acción de una nucleasa específica de sitio que rompe en un sitio diana específico, en donde se inserta una copia del elemento transponible. Los elementos transponibles son por tanto capaces no solo de moverse a sitios no específicos del genoma, sino también de participar en la reorganización específica de genes determinando cambios programados en la expresión génica.

Transposición vía intermediarios de ARN

La mayoría de los transposones en las células eucarióticas son **retrotransposones**, que se trasladan vía transcripción inversa de intermediarios de ARN. En el hombre, hay casi 3 millones de copias de transposones, constituyendo más del 40% del genoma (véase Tabla 5.2). El mecanismo de transposición de estos elementos es similar a la replicación de los retrovirus, los cuales han proporcionado el prototipo de sistema para el estudio de esta clase de secuencias de ADN móviles.

Los **retrovirus** contienen genomas de ARN en sus partículas virales pero se replican mediante la síntesis de un provirus de ADN, que se integra en el cromosoma de ADN de las células infectadas (véase Fig. 4.13). La enzima **transcriptasa inversa** sintetiza una copia de ADN partiendo del ARN viral. A través de este mecanismo se produce la síntesis de una molécula de ADN que contiene repeticiones directas de varios cientos de nucleótidos en ambos extremos (Fig. 6.45). Estas secuencias repetidas, llamadas **repeticiones terminales largas**, o **LTR** (del inglés, *long terminal repeats*), surgen de la duplicación de los sitios del ARN donde se unen los cebadores para comenzar la síntesis de ADN. El ADN viral linear se integra en el cromosoma de la célula huésped mediante un proceso que recuerda a la integración de los elementos transponibles. La integración está catalizada por una proteína de integración viral y se da en muchas secuencias diana diferentes del ADN celular. La proteína de integración rompe dos bases antes de los extremos del ADN viral e introduce un corte monocatenario en el sitio diana del ADN celular. Los extremos colgantes del ADN celular se unen al extremo del ADN viral, y el espacio es rellenado con la síntesis de ADN. El provirus integrado esta por tanto flanqueado por una repetición directa de las secuencias celulares, similar a las repeticiones que flanquean a los transposones de ADN.

El ciclo de vida del virus continúa con la transcripción del provirus integrado, que produce ARN genómico viral como ARNm que dirige la síntesis de las proteínas virales (incluyendo la transcriptasa inversa y la proteína de

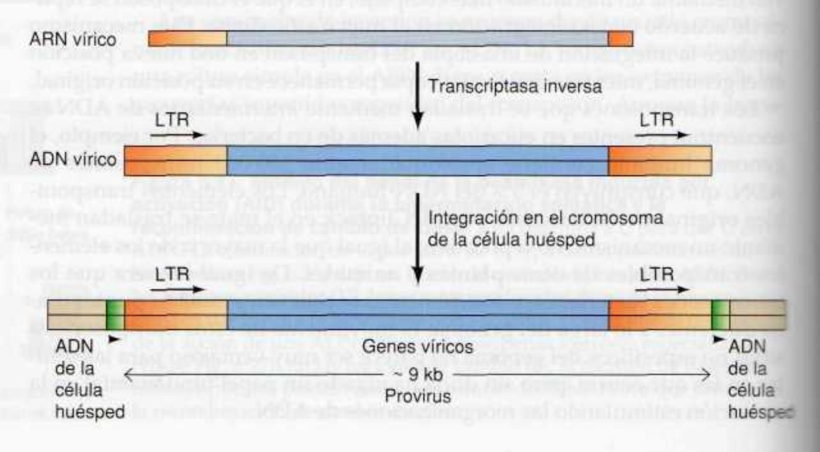


Figura 6.45 Replicación de los retrovirus. La transcriptasa inversa sintetiza una copia de ADN del ARN vírico. Durante la transcripción inversa, las secuencias de ambos extremos del ARN se duplican para formar repeticiones terminales largas (LTR), repeticiones directas de varios cientos de nucleótidos. Los genes del virus, como los necesarios para la síntesis de la transcriptasa inversa, la integrasa y algunas proteínas estructurales del virión, se encuentran flanqueados por LTR. El provirus integrado se encuentra flanqueado por repeticiones directas cortas de ADN de la célula huésped.

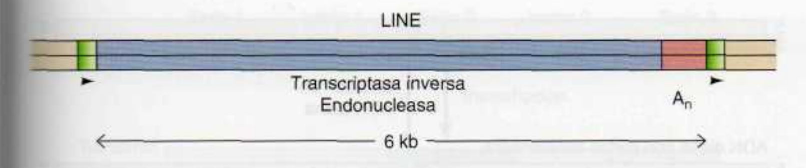


Figura 6.46 Estructura de LINE humanos. Los LINE carecen de LTR, pero codifican la transcriptasa inversa y una endonucleasa. Presenta tramos de secuencias ricas en A (designadas A_n) en sus extremos 3', que se cree que derivan de la transcripción inversa de colas de poli-A añadidas al extremo 3' de los ARNm. Al igual que otros elementos transponibles, los LINE están flanqueados por repeticiones directas cortas del sitio diana del ADN.

integración). El ARN genómico se empaqueta en las partículas virales, que son liberadas de la célula huésped. Esta progenie viral puede infectar a una célula nueva, iniciando así otro proceso de síntesis e integración del ADN. El efecto neto podemos definirlo como el movimiento del provirus desde un sitio cromosómico a otro, mediante la síntesis y la transcripción inversa de un intermediario de ARN.

Algunos retrotransposones (denominados elementos semejantes a los retrovirus) son semejantes a los retrovirus desde el punto de vista estructural. Poseen secuencias LTR en ambos extremos; codifican la transcriptasa inversa y la integrasa; y se transponen (al igual que los retrovirus) mediante la transcripción en ARN, la síntesis de una nueva copia de ADN por acción de la transcriptasa inversa y su integración final en el ADN de la célula huésped. Los elementos semejantes a los retrovirus difieren de los retrovirus en que no se empaquetan en partículas infecciosas, por lo que no pueden diseminarse de una célula a otra. Sin embargo, pueden desplazarse a nuevos puntos cromosómicos de una misma célula a través de mecanismos similares a los observados en la replicación de los retrovirus. Este tipo de retrotransposones representan el 8% del genoma humano.

Otros retrotransposones, conocidos como retrotransposones no LTR, se diferencian de los retrovirus en que no contienen secuencias LTR, aunque sí codifican su propia transcriptasa inversa y una endonucleasa implicada en la transposición. En mamíferos, la clase principal de estos retrotransposones consiste en elementos dispersos largos y altamente repetitivos (**LINE:** *long interspersed elements*), que se repiten aproximadamente 850.000 veces en el genoma y constituyen aproximadamente el 21% del ADN genómico (véase Tabla 5.2). Un elemento LINE completo es de 6 kb de largo, aunque la mayoría de los miembros de la familia están truncados en su extremo 5' (Fig. 6.46). En su extremo 3', los LINE poseen regiones de secuencias ricas en A que se creen derivadas de la transcripción inversa de las colas de poliA que se añaden a los ARNm después de la transcripción (véase Cap. 7). Al igual que otros elementos transponibles, los LINE se encuentran flanqueados por pequeñas repeticiones directas del punto diana del ADN, indicando que la integración implica cortes escalonados y reparación por síntesis.

Puesto que los LINE no contienen secuencias LTR, el mecanismo de su transcripción inversa y posterior integración en el ADN cromosómico debe ser distinto de aquel utilizado por los retrovirus y la clase I (contienen LTR) de retrotransposones. En particular, la transcripción inversa se inicia con la rotura de un extremo del ADN cromosómico por el sitio de integración, que resulta del corte en el sitio diana del ADN por una nucleasa codificada por el retrotransposón (Fig. 6.47). Se inicia por tanto la transcripción inversa con la cola poli-A en el extremo 3' del transposón de ARN y que continúa a lo largo de la molécula. La hebra opuesta de ADN se sintetiza utilizando como cebador el otro extremo roto del sitio diana del ADN, resultando así simultáneas la síntesis y la integración del retrotransposón de ADN.

Otros elementos secuenciales, que no codifican su propia transcriptasa inversa, también se transponen vía intermediarios de ARN. Estos elementos incluyen a las secuencias altamente repetitivas cortas dispersas (**SINE**), de las que existen aproximadamente 1.500.000 copias en los genomas de los

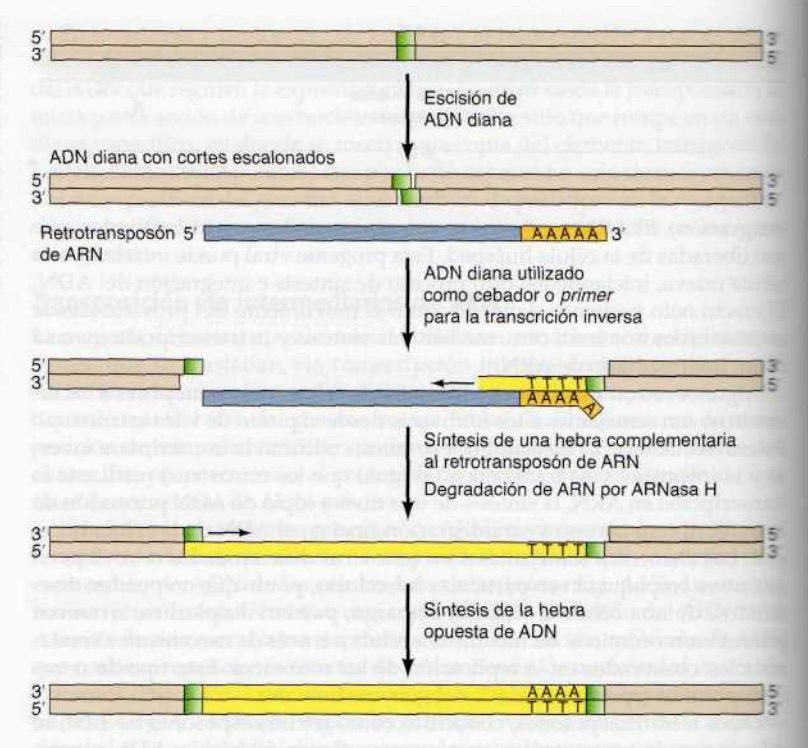


Figura 6.47 Modelo de transcripción inversa e integrador de LINE. El punto diana del ADN es escindido por una nucleasa codificada por el retrotransposón. La transcripción inversa, desencadenada por un extremo roto del ADN diana, se inicia en el interior de la cola de poli-A en el extremo 3′ del retrotransposón de ARN. La síntesis de la hebra opuesta del retrotransposón de ADN se desencadena de forma similar por la otra hebra de ADN en el punto diana.

mamíferos (véase Tabla 5.2). La principal familia que representa a estos elementos se compone de secuencias *Alu*, que constan aproximadamente de 300 bases de longitud. Estas secuencias son ricas en segmentos de poli-A en sus extremos 3′ y están flanqueadas por duplicaciones cortas de las secuencias diana del ADN, una estructura similar a la de los retrotransposones que carecían de secuencias LTR (p. ej., los LINE). Los SINE surgen de la transcripción inversa de pequeños ARN, que incluyen a los ARNt y a pequeños ARN citoplasmáticos implicados en el transporte de proteínas. Puesto que los SINE no codifican productos funcionales del ARN, representan pseudogenes que se forman por la transposición de ARN. Los pseudogenes de muchos genes codificadores de proteínas (llamados **pseudogenes procesados**) surgen de forma similar a través de la transcripción inversa del ARNm (Fig. 6.48). Estos pseudogenes procesados se pueden reconocer fácilmente no sólo por la presencia de los segmentos ricos en A sino también porque se han eliminado los intrones que estaban presentes en el correspondiente gen normal durante el procesamiento del ARNm. La transposición de los SINE y otros pseudogenes procesados se cree que transcurre de manera similar a la transposición de los LINE. Sin embargo, debido a que estos elementos no incluyen los genes para la transcriptasa inversa u otra nucleasa, su transposición presumiblemente implica la acción de transcriptasas inversas y nucleasas que están codificadas en algún otro lugar del genoma —posiblemente por otros retrotransposones, como los LINE.

Aunque los altamente repetitivos SINE y LINE representan una fracción significativa del ADN genómico, su transposición a sitios aleatorios en el genoma parece ser que no resulta muy útil para la célula en la que se encuentran. Estos transposones inducen mutaciones cuando se integran en un sitio diana nuevo, y al igual que las mutaciones inducidas por otros agentes, la mayoría de las mutaciones resultantes de la integración por transposición se espera que sea dañina para la célula. Por ejemplo, las mutaciones resul-

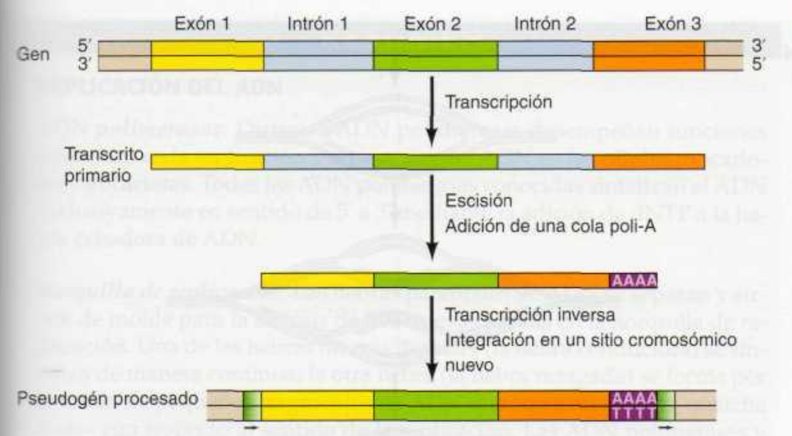


Figura 6.48 Formación de un pseudogén procesado. El gen ilustrado contiene tres exones, separados por dos intrones. Los intrones se eliminan del transcrito primario mediante escisión, y se añade una cola de poli-A al extremo 3′ del ARNm. La transcripción inversa y la integración producen un pseudogén procesado, que no contiene intrones y presenta un tramo rico en A en su extremo 3′. El pseudogén procesado está flanqueado por repeticiones directas cortas del sitio diana del ADN que se generaron durante la integración.

tantes de la transposición tanto de LINE como de SINE se han asociado en algunos casos con hemofilia, distrofia muscular, cáncer de mama y cáncer de colon. Por el contrario, algunas mutaciones derivadas de la transposición de estos elementos puede ser beneficiosa, contribuyendo de manera positiva en la evolución de las especies. Por ejemplo, algunos retrotransposones en los genomas de mamíferos contienen secuencias reguladoras que controlan la expresión de genes adyacentes.

Además de su papel como mutágenos, los retrotransposones también han desempeñado un papel importante en la formación del genoma mediante la estimulación de reorganizaciones del ADN. Por ejemplo, las reorganizaciones del ADN cromosómico pueden resultar de la recombinación entre LINE integrados en diferentes sitios del genoma. Adicionalmente, las secuencias de ADN celular adyacentes a los LINE a menudo son transportadas durante el proceso de transposición. Como consecuencia, la transposición de los LINE puede dar lugar al movimiento de secuencias de ADN celular a sitios nuevos en el genoma. Puesto que los LINE son capaces de integrarse dentro de genes activos, la transposición asociada de las secuencias de ADN celular puede conducir a la formación de nuevas combinaciones de secuencias reguladores y/o codificadoras y contribuir directamente a la evolución de nuevos genes.

La gran mayoría de los elementos transponibles del genoma humano son inactivos, con sólo unas 100 copias de LINE que mantienen las secuencias codificadoras de proteína necesarias para su transposición. No obstante, se estima que la frecuencia de transposición de los LINE humanos sería de 1 de cada 10 a 100 nacimientos. El nivel de actividad transposónica de otras especies, como los ratones, es mucho más alto. Por ejemplo, en el ratón se estima que alrededor del 10% de las mutaciones se deben a procesos de transposición en comparación con una cifra en torno al 0,3% en el ser humano.

Amplificación génica

Las reorganizaciones del ADN que hemos discutido hasta ahora alteraban la posición de una secuencia de ADN dentro del genoma. La **amplificación génica** puede entenderse como un tipo diferente de alteración en la estructura del genoma; incrementa el número de copias de un gen dentro de una célula. La amplificación génica es el resultado de la repetición de la replicación del ADN, produciendo múltiples copias de una región en particular (Fig. 6.49). Las secuencias de ADN amplificadas se pueden encontrar en forma de moléculas extracromosómicas libres o como distribuciones en tándem de secuencias dentro del cromosoma. En cualquier caso, el resultado es

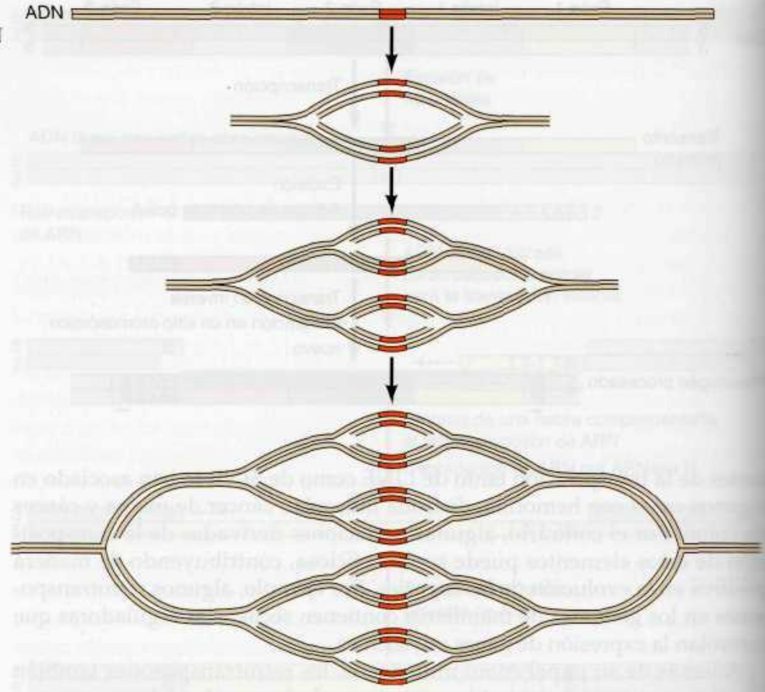


Figura 6.49 Amplificación del ADN. Repetidas vueltas de replicación del ADN producen múltiples copias de una región cromosómica particular.

el aumento de la expresión del gen amplificado, simplemente debido a que están disponibles más copias del gen que será transcrito.

En algunos casos, la amplificación génica es responsable de aumento programado durante el desarrollo de la expresión genética. El ejemplo clásico es la amplificación de los genes de ARN ribosómico en los oocitos (huevos) de los anfibios. Los huevos son células extremadamente grandes, que requieren una síntesis de proteínas muy alta. Los oocitos de los anfibios en particular son aproximadamente un millón de veces más grandes en volumen que una célula somática típica y deben proporcionar grandes cantidades de síntesis de proteínas durante el desarrollo temprano. Para ello es necesario aumentar la síntesis del ARN ribosómico, resuelta en parte por la amplificación de los genes del ARN ribosómico. Tal y como dijimos en el Capítulo 5, en cada genoma existen varios cientos de copias de genes de ARN ribosómico, de manera que se puede producir el suficiente ARNr para atender las necesidades de las células somáticas. En los huevos de los anfibios, estos genes se amplifican 2.000 veces más, aproximadamente un millón de copias por oocito. Otro ejemplo de amplificación génica programada se da en *Drosophila*, en donde los genes que codifican a las proteínas del corion (genes del corion) se amplifican en las células del ovario para producir grandes cantidades de estas proteínas. Al igual que otras reorganizaciones programadas, sin embargo, la amplificación génica es un proceso relativamente infrecuente que ocurre en tipos de células altamente especializadas; no es un mecanismo común en la regulación génica.

La amplificación génica también ocurre como un proceso anormal en las células cancerígenas, en las que, a menudo, incrementa la expresión de los genes que dirigen la proliferación celular (oncogenes), lo que da lugar al crecimiento celular incontrolado y el desarrollo de tumores (véase Cap. 18). Por tanto, al igual que en otros tipos de reorganizaciones del ADN, la amplificación génica puede tener consecuencias beneficiosas o desfavorables para la célula o el organismo en el que tenga lugar.

RESUMEN

REPLICACIÓN DEL ADN

ADN polimerasas: Distintas ADN polimerasas desempeñan funciones diferentes en la replicación y reparación del ADN en las células procariotas y eucariotas. Todas las ADN polimerasas conocidas sintetizan el ADN exclusivamente en sentido de 5′ a 3′ mediante la adición de dNTP a la hebra cebadora de ADN.

Horquilla de replicación: Las hebras parentales de ADN se separan y sirven de molde para la síntesis de dos nuevas hebras en la horquilla de replicación. Una de las hebras nuevas de ADN (la hebra conductora) se sintetiza de manera continua; la otra hebra (la hebra rezagada) se forma por la unión de pequeños fragmentos de ADN que son sintetizados «marcha atrás» con respecto al sentido de la replicación. Las ADN polimerasas y otras muchas proteínas actúan de manera coordinada para sintetizar a las hebras conductora y rezagada del ADN.

Fidelidad de la replicación: Las ADN polimerasas aumentan la exactitud de la replicación a través de la selección de la base correcta y la doble lectura del ADN recién sintetizado para eliminar las bases desapareadas.

Orígenes e inicio de la replicación: La replicación del ADN comienza en orígenes específicos de replicación, que contienen los sitios de unión para las proteínas que inician el proceso. En los eucariotas superiores, los orígenes pueden estar definidos por la estructura cromatínica en lugar de por una secuencia de ADN.

Telómeros y telomerasa: replicación de los extremos del cromosoma: Las secuencias repetidas teloméricas en los extremos de los cromosomas se replican por la acción de la transcriptasa inversa (telomerasa) que contiene su propio molde de ARN.

REPARACIÓN DEL ADN

Inversión directa del ADN dañado: Algunos tipos de lesiones comunes del ADN, como los dímeros de pirimidina y los residuos de guanina alquilados, son reparados por la inversión directa del daño.

Reparación por escisión: La mayoría de los daños en el ADN son reparados mediante la escisión del ADN dañado. El espacio resultante se rellena con ADN recién sintetizado, usando a la hebra complementaria no dañada como molde. En la reparación por escisión de las bases, se elimina de la molécula de ADN a tipos específicos de bases dañadas. Por el contrario, los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos reconocen a una vasta variedad de bases dañadas como parte de un oligonucleótido. Un tercer tipo de sistema de reparación por escisión elimina específicamente las bases desemparejadas de las hebras de ADN recién sintetizadas.

Síntesis de ADN translesión: ADN polimerasas especializadas son capaces de replicar el ADN opuesto a un punto de ADN dañado, aunque la acción de estas polimerasas resulta en una elevada frecuencia de incorporación de bases incorrectas.

PALABRAS CLAVE

ADN polimerasa

horquilla de replicación, fragmento de Okazaki, ADN ligasa, hebra conductora, hebra tardía, primasa, exonucleasa, ARNasa H, helicasa, proteína de unión a la hebra simple de ADN, topoisomerasa

doble lectura

origen de replicación, secuencia de replicación autónoma (ARS), complejo de origen de replicación (ORC)

telómero, telomerasa, transcriptasa inversa

dímero de pirimidina, fotorreactivación

reparación por escisión de bases, ADN glicosilasa, AP endonucleasa, reparación por escisión de nucleótidos, escinucleasa, reparación acoplada a la transcripción, reparación de errores

síntesis de ADN translesión

PALABRAS CLAVE

roturas de doble hebra
reparación recombinatoria

recombinación homóloga, modelo de Holliday, unión o intermediario de Holliday

RecA

recombinación específica de sitio, antígeno, inmunoglobulina, receptor de células T, recombinación de cambio de clase, hipermutación somática, deaminasa inducida por activación (AID)

RESUMEN

Reparación de roturas de doble hebra: Las roturas de doble hebra se reparan por medio de la unión de las hebras dañadas mediante recombinación. La reparación recombinatoria puede darse tanto por medio de recombinación homóloga con un cromosoma intacto como a través de la unión no homóloga de los extremos rotos de una molécula sencilla de ADN.

RECOMBINACIÓN ENTRE SECUENCIAS HOMÓLOGAS DE ADN

Modelos de recombinación homóloga: La recombinación implica la rotura y reunión de moléculas de ADN parentales. La alineación entre las moléculas de ADN homólogas proporciona el apareamiento complementario de las bases. Las hebras de ADN parental «melladas» invaden a la otra molécula parental, produciendo un intermediario de hebras cruzadas conocido como unión o intermediario de Holliday. Las moléculas recombinantes se forman después por escisión y unión de las hebras cruzadas.

Enzimas involucradas en la recombinación homóloga: La enzima central de la recombinación homóloga es RecA, que cataliza el intercambio de hebras entre los ADN homólogos. Otras enzimas cortan y desenrollan los ADN parentales y resuelven las uniones de Holliday.

REORGANIZACIÓN DEL ADN

Recombinación específica de sitio: La recombinación específica de sitio tiene lugar entre secuencias específicas de ADN que son reconocidas por proteínas que permiten el proceso. En los vertebrados, la recombinación específica de sitio desempeña un papel esencial en la generación de inmunoglobulinas y genes de los receptores de las células T durante el desarrollo del sistema inmune. Se proporciona diversidad adicional a los genes de inmunoglobulinas mediante hipermutación somática y recombinación de cambio de clase.

Transposición vía intermediarios de ADN: La mayoría de los transposones se mueven a lo largo del genoma sin necesidad secuencias específicas de ADN en sus sitios de inserción. En levaduras y protozoos, sin embargo, la transposición de algunas secuencias de ADN a dianas específicas son el resultado de organizaciones programadas del ADN que regulan la expresión génica.

Transposición vía intermediarios de ARN: La mayoría de los transposones en las células eucariotas se mueven mediante la transcripción inversa de intermediarios de ARN, de forma similar a la replicación de los retrovirus. Estos retrotransposones incluyen a las secuencias altamente repetitivas LINE y SINE de los genomas de mamíferos.

Amplificación génica: La amplificación génica resulta de la replicación repetitiva de una región cromosómica. En algunos casos, la amplificación génica proporciona un mecanismo de aumento de la expresión de los genes durante el desarrollo. La amplificación génica también se produce con frecuencia en las células cancerígenas, pudiendo originar la elevada expresión de los genes que contribuyen a la proliferación celular incontrolada.

Preguntas

1. Has aislado una cepa sensible a la temperatura de *E. coli* con una mutación en la ADN polimerasa I. ¿Qué defectos, si los hay, observarías en bacterias que portan esta mutación a altas temperaturas?

2. Compara y contrasta las acciones de las topoisomerasas I y II.

3. ¿Cuál es el número aproximado de fragmentos de Okazaki sintetizados durante la replicación del genoma de levaduras?

4. ¿Por qué la síntesis de fragmentos de Okazaki se inicia por la primasa en lugar de una ADN polimerasa?

5. ¿Cuál es la función de la actividad exonucleasa de 3′ a 5′ de las ADN polimerasa? ¿Cuál sería la consecuencia de mutar esta actividad de la ADN polimerasa III sobre la fidelidad de la replicación del ADN de *E. coli*?

6. ¿Cómo averiguarías en una levadura si una secuencia de ADN posee un origen de replicación?

7. Las células de levadura requieren la telomerasa para replicar por completo su genoma, mientras que *E. coli* no requiere esta enzima especial. ¿Por qué?

8. ¿Qué mecanismo emplea una célula para reparar roturas de doble hebra en su ADN? ¿Cómo difiere esto de la reparación de las roturas en una sola hebra?

9. Los pacientes de xeroderma pigmentosa sufren una incidencia altísima de cáncer de piel aunque no se ha encontrado la misma incidencia en cánceres de órganos internos (p. ej., cáncer de colon). ¿Qué sugiere esto acerca de los daños del ADN responsables de la mayoría de los cánceres internos?

10. Muchos medicamentos de uso clínico para el tratamiento del sida son inhibidores de la transcriptasa inversa del VIH. ¿Qué otros procesos celulares podrían verse afectados por estos inhibidores?

11. ¿El sistema de reparación de falsos apareamientos en humanos incluye los homólogos de *E. coli MutS* y *MutL* pero no de *MutH*. ¿Por qué?

12. ¿Qué fenotipo tendría un ratón mutante que carece de uno de los genes necesarios para la recombinación específica de sitio en los linfocitos?

Bibliografía

Replicación del ADN

Annunziato, A. T. 2005. Split decision: What happens to nucleosomes during DNA replication? *J. Biol. Chem.* 280: 12065-12068. [R]

Bell, S. P. and A. Dutta. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 333–374. [R]

Blackburn, E. H. 2005. Telomeres and telomerase: Their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett.* 579: 859–862. [R]

Blasco, M. A. 2007. Telomere length, stem cells and aging. *Nature Rev. Chem. Biol.* 3: 640-649. [R]

Champoux, J. J. 2001. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 369–413. [R]

Cozzarelli, N. R., G. J. Cost, M. Nollmann, T. Uiard and J. E. Stray. 2006. Giant proteins that move DNA: bullies of the genomic playground. *Nature Mol. Cell Bio.* 7: 580-588. [R]

Cvetic, C. and J. C. Walter. 2005. Eukaryotic origins of DNA replication: Could you please be more specific? *Sem. Cell Dev. Biol.* 16: 343–353. [R]

Frick, D. N. and C. C. Richardson. 2001. DNA primases. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 39–80. [R]

Gilbert, D. M. 2004. In search of the holy replicator. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 1–8. [R]

Gilson, E. and V. Geli. 2007. How telomeres are replicated. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 825-838. [R]

Greider, C. W. and E. H. Blackburn. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405-413. [P]

Huberman, J. A. and A. D. Riggs. 1968. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J. Mol. Biol.* 32: 327–341. [P]

Johnson, A. and M. O'Donnell. 2005. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Ann. Rev. Biochem.* 74: 283-315. [R]

Kornberg, A., I. R. Lehman, M. J. Bessman and E. S. Simms. 1956. Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 21: 197–198. [P]

Machida, Y. J., J. L. Hamlin and A. Dutta. 2005. Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 123: 13-24. [R]

McCulloch, S. D. and T. A. Kunkel. 2008. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res.* 18: 148-161. [R]

Moldovan, G.-L., B. Pfander and S. Jentsch. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129: 665-679. [R]

Pursell, Z. G., I. Isoz, E.-B. Lundstrom, E. Johansson and T. A. Kunkel. 2007. Yeast DNA polymerase ε participates in leading-strand DNA replication. *Science* 317: 127-130. [P]

Robinson, N. P. and S. D. Bell. 2005. Origins of DNA replication in the three domains of life. *FEBS J.* 272: 3757-3766. [R]

Stillman, B. 2008. DNA polymerases at the replication fork in eukaryotes. *Mol. Cell* 30: 259-260. [R]

Stinthcomb, D. T., K. Struhl and R. W. Davis. 1979. Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282: 39–43. [P]

Verdun, R. E. and J. Karlseder. 2007. Replication and protection of telomeres. *Nature* 447: 924-931. [R]

Reparación del ADN

Cleaver, J. E. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* 218: 652–656. [P]

David, S. S., V. L. O'Shea and S. Kundu. 2007. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447: 941-950. [R]

Essen, L. O. and T. Klar. 2006. Light-driven DNA repair by photolyases. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1266-1277. [R]

Fishel, R., M. K. Lescoe, M. R. S. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane and R. Kolodner. 1993. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027–1038. [P]

Fousteri, M. and L. H. F. Mullenders. 2008. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 18: 73-84. [R]

Friedberg, E. C., A. R. Lehmann and R. P. P. Fuchs. 2005. Trading places: How do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol. Cell* 18: 499–505. [R]

Friedberg, E. C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz and T. Ellenberger. 2005. *DNA Repair and Mutagenesis.* Washington, D.C.: ASM Press.

Hegde, M. L., T. K. Hazra and S. Mitra. 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 18: 27-47. [R]

Hoeijmakers, J. H. J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366–374. [R]

Jiricny, J. 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 335-346. [R]

Leach, F. S. and 34 others. 1993. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75: 1215–1225. [P]

Lehmann, A. R., A. Niimi, T. Ogi, S. Brown, S. Sabbioneda, J. F. Wing, P. L. Kannouche and C. M. Green. 2007. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair* 6: 891-899. [R]

Li, G.-M. 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18: 85-98. [R]

Lieber, M. R. 2008. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* 283: 1-5. [R]

Modrich, P. 2006. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 281: 30305-30309. [R]

Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, K. Ünsal-Kaçmaz and S. Linn. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 39–85. [R]

Savery, N. J. 2007. The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. *Trends Microbiol.* 15: 326-333. [R]

Sedgwick, B., P. A. Bates, J. Paik, S. C. Jacobs and T. Lindahl. 2007. Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair* 6: 429-442. [R]

Shuck, S. C., E. A. Short and J. J. Turchi. 2008. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res.* 18: 64-72. [R]

Thorlund, T. and S. C. West. 2007. BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* 26: 7720-7730. [R]

Recombinación entre secuencias homólogas de ADN

Cox, M. M. 2007. Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 127-138. [R]

DasGupta, C., A. M. Wu, R. Kahn, R. P. Cunningham and C. M. Radding. 1981. Concerted strand exchange and formation of Holliday structures by *E. coli* RecA protein. *Cell* 25: 507–516. [P]

Holliday, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5: 282-304. [P]

Krogh, B. O. and L. S. Symington. 2004. Recombination proteins in yeast. *Ann. Rev. Genet.* 38: 233–271. [R]

Liu, Y. and S. C. West. 2004. Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 937–946. [R]

Neale, M. J. and S. Keeney. 2006. Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature* 442: 153-158. [R]

Potter, H. and D. Dressler. 1976. On the mechanism of genetic recombination: Electron microscopic observation of recombination intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3000–3004. [P]

San Filippo, J., P. Sung and H. Klein. 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 77: 9.1-9.29. [R]

Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein and F. W. Stahl. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33: 25–35. [P]

Reorganización del ADN

Belancio, V. P., D. J. Hedges and P. Deininger. 2008. Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome Res.* 18: 343-358. [R]

Chaudhuri, J. and F. W. Alt. 2004. Class-switch recombination: Interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nature Rev. Immunol.* 4: 541–552. [R]

Claycomb, J. M. and T. L. Orr-Weaver. 2005. Developmental gene amplification: Insights into DNA replication and gene expression. *Trends Genet.* 21: 149–162. [R]

Di Noia, J. M. and M. S. Neuberger. 2007. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 1-22. [R]

Fedoroff, N. and D. Botstein. 1992. *The Dynamic Genome: Barbara McClintock's Ideas in the Century of Genetics.* Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Han, J. S. and J. D. Boeke. 2005. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? *BioEssays* 27: 775-784. [R]

Honjo, T., H. Nagaoka, R. Shinkura and M. Muramatsu. 2005. AID to overcome the limitations of genomic information. *Nature Immunol.* 6: 655–661. [R]

Hozumi, N. and S. Tonegawa. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3628–3632. [P]

Jung, D. and F. W. Alt. 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Ann. Rev. Immunol.* 24: 541-570. [R]

Kazazian, H. H. Jr. 2004. Mobile elements: Drivers of genome evolution. *Science* 3 1626–1632. [R]

Longerich, S., U. Basu, F. Alt and U. Storb. 2006. AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 164-174, [R]

Maizels, N. 2005. Immunoglobulin gene diversification. *Ann. Rev. Genet.* 39: 23– [R]

McClintock, B. 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21: 197–216. [P]

Mills, R. E., A. Bennett, R. C. Iskow and S. E. Devine. 2007. Which transposable elements are active in the human genome? *Trends Genet.* 23: 183-191. [R]

Teng, G. and F. N. Papavasiliou. 2007. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Ann. Rev. Genet.* 41: 107-120. [R]

Tower, J. 2004. Developmental gene amplification and origin regulation. *Ann. Rev. Genet.* 38: 273–304. [R]

CAPÍTULO 7

Síntesis y maduración del ARN

EN LOS CAPÍTULOS 5 Y 6 SE TRATA LA ORGANIZACIÓN y mantenimiento del ADN genómico, que es considerado como el conjunto de instrucciones que dirigen todas las actividades celulares. Estas instrucciones se llevan a cabo por medio de la síntesis de ARN y proteínas. El comportamiento de una célula está determinado no sólo por el conjunto de genes que ha heredado sino también por cuáles de estos genes se expresan en un momento determinado. La regulación de la expresión génica permite a las células adaptarse a los cambios en el ambiente y es responsable de las distintas actividades llevadas a cabo por los múltiples tipos celulares que componen a los animales y plantas complejos. Las células musculares y hepáticas, por ejemplo, contienen los mismos genes; la función de estas células está determinada no por diferencias en sus genomas, sino por patrones regulados de expresión génica que dirigen el desarrollo y la diferenciación.

El primer paso en la expresión de un gen, la transcripción del ADN a ARN, es el nivel primario de regulación de la expresión génica en procariotas y eucariotas. En células eucariotas los ARN son modificados de varias formas —por ejemplo, eliminando los intrones por corte y empalmado— para transformar el transcrito primario en su forma funcional. Los distintos tipos de ARN tienen diferentes funciones en las células: el ARN mensajero (ARNm) sirve de molde para la síntesis de proteínas; el ARN ribosómico (ARNr) y el ARN de transferencia (ARNt) participan en la traducción del ARNm. Otros ARN de pequeño tamaño intervienen en el corte y empalmado de ARNm y en la clasificación de proteínas en eucariotas. De hecho, algunos de los avances más interesantes en los últimos años están relacionados con los papeles de ARN no codificantes (microARN) como reguladores tanto de la expresión génica como de la traducción en células eucariotas. En este capítulo se discuten los procesos de síntesis y maduración del ARN. El paso final de la expresión génica, la traducción del ARNm a proteínas, es el tema del Capítulo 8.

Transcripción en procariotas

Como en la mayoría de las áreas de la biología molecular, el estudio de *E. coli* ha proporcionado el modelo para posteriores investigaciones acerca de la transcripción en eucariotas. El ARNm fue descubierto en primer lugar en la *E.coli*, como fue expuesto en el Capítulo 4. También fue *E. coli* el primer organismo del que se aisló y purificó la ARN polimerasa. A partir de experi-

mentos en *E. coli* fueron aclarados los mecanismos básicos por los que se regula la transcripción. En estos ensayos se observó que la regulación de la expresión génica posibilita al organismo a responder a cambios en su entorno, como variaciones en la disponibilidad de nutrientes. La comprensión de la transcripción en *E. coli* ha supuesto la base para los estudios acerca de los mecanismos que regulan la expresión génica en eucariotas, de mucha mayor complejidad.

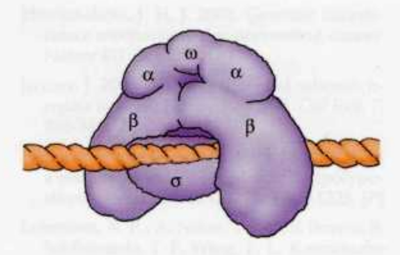


Figura 7.1 ARN polimerasa de *E. coli.* La enzima completa consta de seis subunidades: dos α, una β, una β', una ω y una σ. La subunidad σ está unida de forma relativamente débil y puede disociarse de las otras cuatro subunidades, que constituyen el núcleo de la polimerasa.

ARN polimerasa y transcripción

La principal enzima responsable de la síntesis de ARN es la **ARN polimerasa**, que cataliza la polimerización de ribonucleósidos 5'-trifosfato (NTP) dirigida por un molde de ADN. La síntesis de ARN es similar a la de ADN, y como la ADN polimerasa, la ARN polimerasa cataliza el crecimiento de la cadena de ARN en dirección 5'-3'. Sin embargo, a diferencia de la ADN polimerasa, la ARN polimerasa no requiere un cebador preformado para iniciar la síntesis de ARN. En lugar de ello, la transcripción empieza *de novo* en secuencias específicas al principio de los genes. El proceso de iniciación es especialmente importante porque es el primer paso que regula la transcripción.

La ARN polimerasa, como la ADN polimerasa, es una enzima compleja compuesta de múltiples cadenas polipeptídicas. La enzima intacta se compone de cuatro tipos distintos de subunidades, denominadas α, β, β', ω y σ (Fig. 7.1). La subunidad σ está unida de forma relativamente débil y puede separarse de las otras subunidades, generando un núcleo de la polimerasa que consiste en dos subunidades α, una β, una β', y una ω. El núcleo de la polimerasa es totalmente capaz de catalizar la incorporación de NTP al ARN, lo cual implica que la subunidad σ no es necesaria para la actividad catalítica básica de la enzima. Sin embargo, el núcleo de la polimerasa no se une específicamente a las secuencias que señalizan la iniciación normal de la transcripción; por tanto, la subunidad σ es necesaria para identificar los lugares adecuados para iniciar la transcripción. La selección de estos sitios es un elemento crítico en la transcripción, porque la síntesis de un ARN funcionante debe comenzar al principio del gen. La mayoría de las bacterias, como *E. coli*, poseen diferentes subunidades σ que dirigen a la ARN polimerasa hacia distintos tipos de sitios de inicio de la transcripción en función de las condiciones imperantes; por ejemplo, en condiciones de inanición o en condiciones de disponibilidad de nutrientes.

La secuencia de ADN a la que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen se denomina **promotor**. Las secuencias de ADN cuya función es actuar de promotores fueron identificadas en primer lugar en *E.coli* comparando las secuencias nucleotídicas de una serie de genes aislados. Esta comparación reveló que en la región corriente arriba (5') del sitio de iniciación de la transcripción existen dos tramos de secuencias que son similares en muchos genes. Estas regiones comunes abarcan seis nucleótidos cada una, y se encuentran aproximadamente a 10 y 35 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 7.2). Se conocen como secuencias –10 y –35, indicando su posición relativa respecto al sitio de inicio de la transcripción, que se define como el sitio +1. Las secuencias –10 y –35 de distintos promotores no son idénticas, pero tienen una similitud suficiente para establecer secuencias de consenso —las bases más frecuentemente encontradas en cada posición.

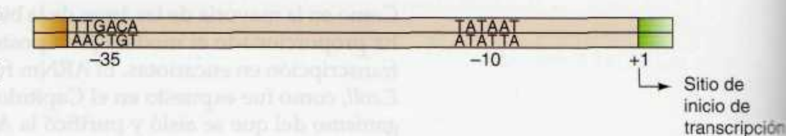


Figura 7.2 Secuencias de los promotores de *E. coli.* Los promotores de *E. coli* se componen de dos grupos de secuencias localizadas a 10 y 35 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de transcripción (+1). Las secuencias consenso representadas son las bases más frecuentemente encontradas en diferentes promotores.

Diversas fuentes de evidencia experimental han puesto de manifiesto la importancia funcional de las secuencias promotoras –10 y –35. En primer lugar, los genes con promotores que difieren las secuencias consenso son transcritos de una forma menos eficiente que aquellos genes cuyos promotores se asemejan más a las secuencias consenso. Segundo, las mutaciones introducidas en cualquiera de las dos secuencias consenso tienen un gran efecto en la función promotora. En tercer lugar, los sitios de unión de la ARN polimerasa a los promotores han sido identificados mediante la **técnica *footprinting* de ADN**, utilizada de forma habitual para determinar los sitios en los que se unen las proteínas al ADN (Fig. 7.3). En este tipo de ensayos se marca en un extremo con un radioisótopo o un colorante fluorescente. El ADN marcado se incuba con la proteína de interés (p. ej., ARN polimerasa) y se somete a digestión parcial por medio de una ADNasa. El método se

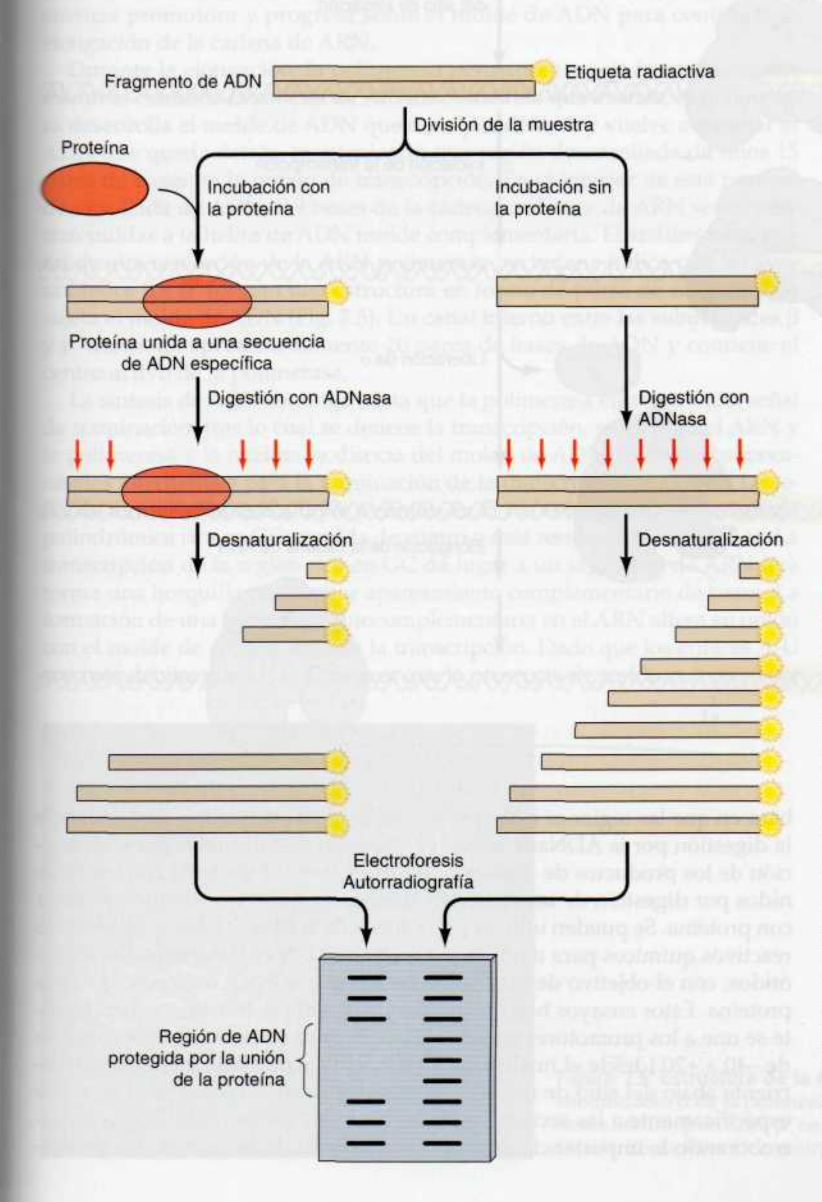


Figura 7.3 Técnica del *footprinting* del ADN. Se divide en dos una muestra que contiene fragmentos de ADN marcados radiactivamente en un extremo, y una mitad de la muestra se incuba con una proteína que se une a una secuencia específica de ADN dentro del fragmento. Ambas muestras son digeridas con una ADNasa, de tal forma que la ADNasa introduzca una media de un corte por molécula. La región de DNA unida a la proteína está protegida de la digestión por la ADNasa. Los complejos ADN-proteína son desnaturalizados, y se analiza mediante electroforesis el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos por la ADNasa y marcados radiactivamente (igual que para la secuenciación del ADN). En la muestra de ADN que fue incubada con la proteína están ausentes los fragmentos de ADN resultantes de la digestión por la ADNasa de la región protegida por la unión de dicha proteína.

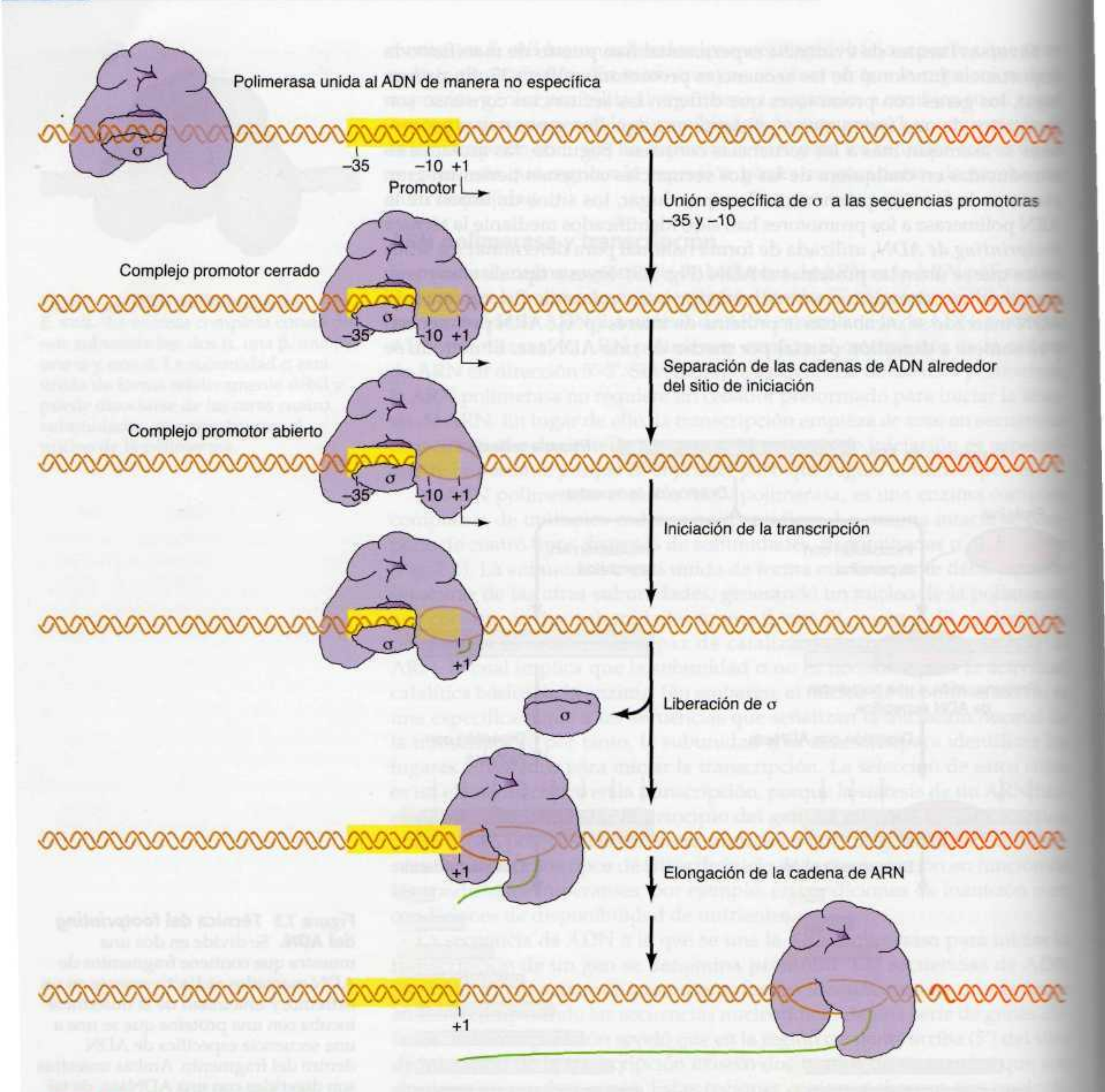


Figura 7.4 Transcripción mediante la ARN polimerasa de *E. coli*. La polimerasa se une inicialmente al ADN de forma no específica y recorre la molécula hasta que la subunidad σ se une a los promotores –35 y –10, dando lugar a un complejo promotor cerrado. Entonces la polimerasa va separando las dos cadenas de ADN alrededor del sitio de iniciación, y comienza la transcripción mediante la polimerización de los NTP libres. La subunidad σ se separa del núcleo de la polimerasa, que se desplaza a lo largo del ADN y va alargando la cadena de ARN en crecimiento.

basa en que las regiones a las que se une la proteína quedan protegidas de la digestión por la ADNasa. Estas regiones son identificables por comparación de los productos de digestión del ADN unido a proteína con los obtenidos por digestión de una muestra idéntica de ADN que no fue incubada con proteína. Se pueden utilizar variaciones de la técnica básica, empleando reactivos químicos para modificar y cortar el ADN en determinados nucleótidos, con el objetivo de identificar las bases que están en contacto con la proteína. Estos ensayos han mostrado que la ARN polimerasa generalmente se une a los promotores en una región de unos 60 pares de bases, que va de –40 a +20 (desde el nucleótido 40 corriente arriba al nucleótido +20 corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción). La subunidad σ se une específicamente a las secuencias de las regiones promotoras –35 y –10, corroborando la importancia de estas secuencias en la función de los promo-

tores de la transcripción. Algunos promotores de *E. coli* poseen una tercera secuencia, corriente arriba de la región –35, a la que se une la subunidad α de la ARN polimerasa.

En ausencia de la subunidad σ, la ARN polimerasa se une al ADN de forma no específica y con baja afinidad. La función de σ es dirigir a la polimerasa a los promotores uniéndose específicamente a las secuencias –35 y –10, para iniciar la transcripción en el principio del gen (Fig. 7.4). El conjunto formado inicialmente entre la polimerasa y el promotor se denomina complejo promotor cerrado dado que el ADN no está desenrollado. La polimerasa después desenrolla unas 12-14 bases de ADN alrededor del sitio de inicio para dar un complejo promotor abierto en el que ya está disponible una hebra única de ADN para servir como molde para su transcripción, la cual comienza con la incorporación de dos NTP. Tras la adición de unos diez nucleótidos la subunidad σ se separa de la polimerasa, que abandona la secuencia promotora y progresa sobre el molde de ADN para continuar la elongación de la cadena de ARN.

Durante la elongación, la polimerasa permanece asociada con su molde mientras continúa la síntesis de ARNm. A medida que avanza, la polimerasa desenrolla el molde de ADN que tiene por delante y vuelve a enrollar el ADN que queda detrás, manteniendo una región desenrollada de unos 15 pares de bases en la región de transcripción. En el interior de esta porción desenrollada de ADN, 8-9 bases de la cadena creciente de ARN se encuentran unidas a la hebra de ADN molde complementaria. El análisis estructural de alta resolución de la ARN polimerasa bacteriana indica que las subunidades β y β' forman una estructura en forma de pinza de cangrejo que sujeta el molde de ADN (Fig. 7.5). Un canal interno entre las subunidades β y β' acomoda aproximadamente 20 pares de bases de ADN y contiene el centro activo de la polimerasa.

La síntesis de ARN continúa hasta que la polimerasa encuentra una señal de terminación, tras lo cual se detiene la transcripción, se separan el ARN y la polimerasa y la enzima se disocia del molde de ADN. Existen dos mecanismos alternativos para la terminación de la transcripción en *E. coli*. La señal de terminación más simple y común en *E. coli* consiste en una secuencia palindrómica rica en GC seguida de cuatro o más residuos de A (Fig. 7.6). La transcripción de la región rica en GC da lugar a un segmento de ARN que forma una horquilla estable por apareamiento complementario de bases. La formación de una estructura autocomplementaria en el ARN altera su unión con el molde de ADN y finaliza la transcripción. Dado que los enlaces A-U son más débiles que los G-C, se cree que la presencia de residuos A corriente

7.1 Animación web

Transcripción

La transcripción es la síntesis de ARN dirigida por el ADN, catalizada por la enzima ARN polimerasa.

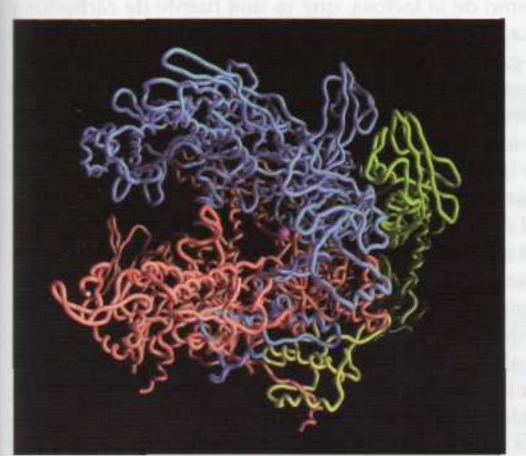


Figura 7.5 Estructura de la ARN polimerasa bacteriana. Las subunidades α de la polimerasa aparecen de color verde claro y verde oscuro, β en azul, β' en rosa y ω en amarillo. (Cortesía de Seth Darset, Rockefeller University.)

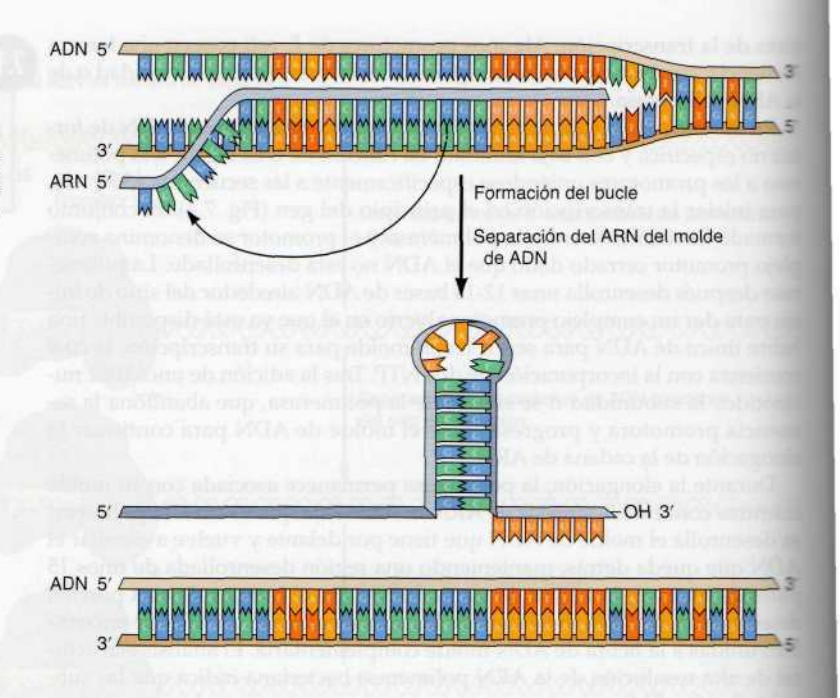


Figura 7.6 Terminación de la transcripción. La terminación de la transcripción está señalada por una repetición invertida rica en G-C seguida de cuatro residuos A. La repetición invertida forma en el ARN una estructura tipo bucle estable que obliga al ARN a disociarse del molde de ADN.

abajo de la secuencia palindrómica facilita la disociación del ARN del molde. Alternativamente, la transcripción de algunos genes se termina mediante una proteína específica de terminación (denominada Rho), que se une a los segmentos extendidos (mayores de 60 nucleótidos) de ARN de hebra sencilla. Puesto que los ARNm de bacterias se asocian con ribosomas y son traducidos mientras que son transcritos, dichas regiones extendidas de ARN de hebra sencilla están expuestas sólo en el extremo de un ARNm.

Control negativo de la transcripción y represores

La transcripción puede regularse en los estadios de iniciación y elongación, pero la mayoría de la regulación transcripcional en bacterias opera al nivel de iniciación. Los estudios pioneros sobre regulación génica en *E. coli* fueron llevados a cabo por François Jacob y Jacques Monod en los años 50. Estos investigadores y sus colaboradores analizaron la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa, que es una fuente de carbonos y energía tras ser hidrolizada a glucosa y galactosa (Fig. 7.7). La enzima que cataliza esta reacción (β-galactosidasa) y otras enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa están presentes únicamente cuando existe lactosa en el medio. En caso contrario la bacteria es capaz de economizar no invirtiendo energía en la síntesis innecesaria de ARN y proteínas. Por tanto, la lactosa induce la síntesis de las enzimas implicadas en su metabolismo. En el metabolismo de la lactosa intervienen otras dos enzimas cuyos genes se encuentran muy ligados al de la β-galactosidasa: son la galactósido permeasa, que transporta lactosa al interior de la célula, y una transacetilasa, cuya función en esta vía metabólica todavía se desconoce.

Basándose en experimentos puramente genéticos, Jacob y Monod dedujeron el mecanismo de regulación de estos genes, formulando un modelo que sigue vigente para el entendimiento de la regulación transcripcional. Los genes que codifican la β-galactosidasa, la permeasa y la transacetilasa, se expresan en una unidad única, denominada un **operón** (Fig. 7.8). El estudio de mutantes con una regulación defectuosa de estos genes hizo posible

la identificación de dos loci distintos, denominados *o* e *i*, que controlaban la expresión del operón. El locus *o* (el **operador**), situado junto al sitio de inicio de la transcripción, controla la transcripción del operón. El gen *i*, que no se encuentra dentro del operón, codifica una proteína que regula la transcripción al unirse al ADN del operador. Cabe destacar que los mutantes que no sintetizan un producto funcional del gen *i* se caracterizan por la expresión constitutiva del operón incluso en ausencia de lactosa. Este dato señala que el producto normal del gen *i* actuaría como un **represor** que inhibiría la transcripción al unirse a *o*. La adición de lactosa supone la inducción del operón como consecuencia de la unión de este nutriente al represor, lo que impediría su asociación con el ADN del operador.

Se obtuvo confirmación experimental de este modelo a partir de una serie de ensayos, entre los que destaca el aislamiento en los años 60 por Walter Gilbert del represor *lac* y el análisis de su unión al operador en el ADN, definido como una zona de unos 20 pares de bases situada poco antes del sitio de inicio de transcripción. Los análisis por medio de la técnica del *footprinting* han identificado esta región como el sitio de unión del represor, que bloquea la transcripción. La lactosa, como se predijo, se une al represor, lo cual evita su acción sobre el operador.

El principio central de regulación génica ejemplificado por el operón lactosa es que el control de la transcripción está mediado por la interacción de proteínas reguladoras con secuencias de ADN específicas. Este modo de regulación es aplicable de forma general a células procariotas y eucariotas. Las secuencias reguladoras del tipo del operador se denominan **elementos de control de acción en *cis***, dado que afectan únicamente a la ex-

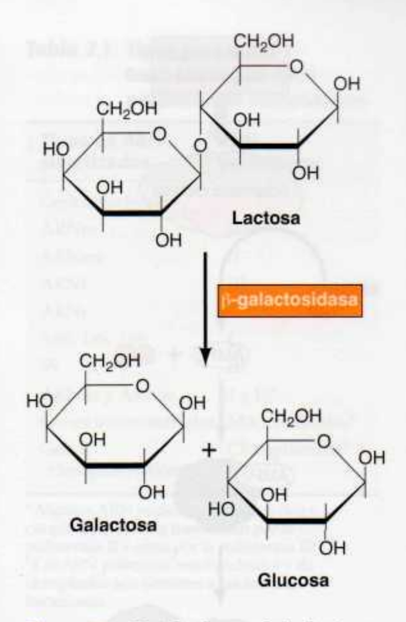


Figura 7.7 Metabolismo de la lactosa. La β-galactosidasa cataliza la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa.

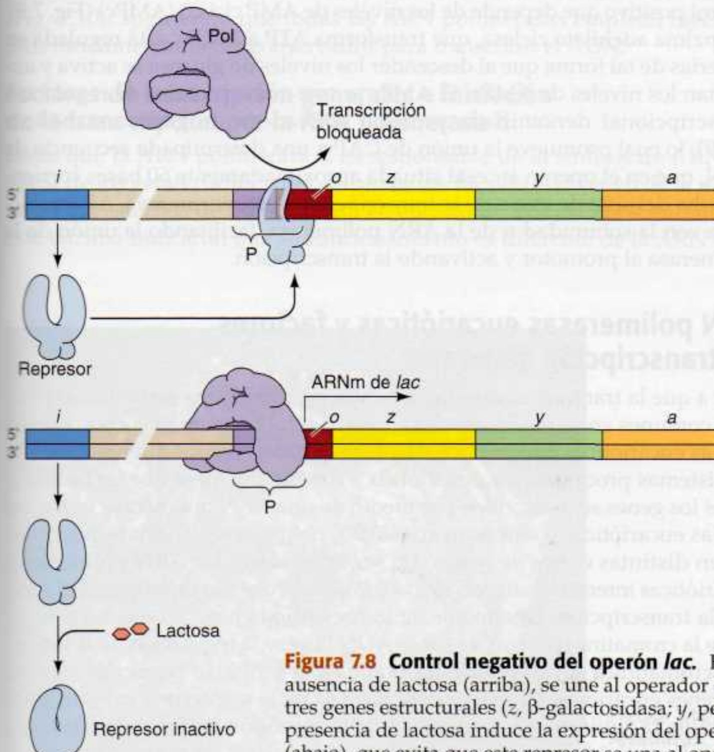


Figura 7.8 Control negativo del operón *lac*. El gen *i* codifica un represor que, en ausencia de lactosa (arriba), se une al operador (*o*) y bloquea la transcripción de los tres genes estructurales (*z*, β-galactosidasa; *y*, permeasa; y *a*, transacetilasa). La presencia de lactosa induce la expresión del operón mediante la unión al represor (abajo), que evita que este represor se una al operador. P = promotor; Pol = polimerasa.

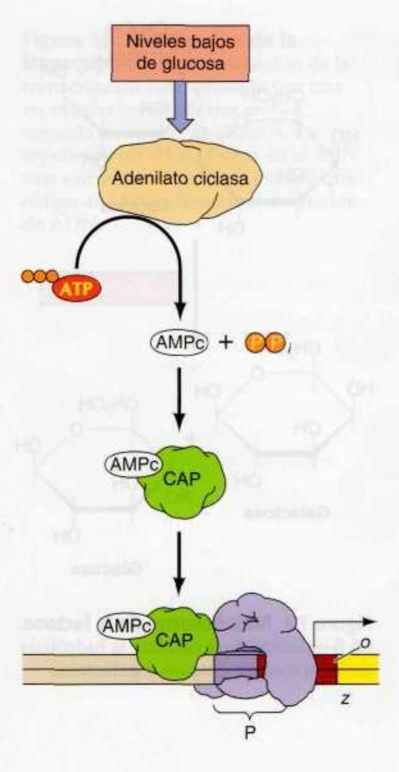


Figura 7.9 Control positivo del operón *lac* por la glucosa. Los niveles de glucosa activan la adenilato ciclasa, que transforma el ATP en AMP cíclico (AMPc). El AMP cíclico se une después a la proteína activadora del catabolismo (CAP) y favorece su unión a las secuencias reguladoras de distintos operones relacionados con el metabolismo de azúcares alternativos, como la lactosa. La CAP interacciona con la subunidad α de la ARN polimerasa para activar la transcripción.

presión de genes presentes en la misma molécula de ADN. Por otro lado, las proteínas del tipo del represor se denominan **factores de acción en *trans***, dado que intervienen en la expresión de genes localizados en otros cromosomas de la célula. El operón *lac* es un ejemplo de control negativo porque la unión del represor bloquea la transcripción. Sin embargo, no siempre ocurre así; muchos factores que activan en *trans* son activadores de la transcripción.

Control positivo de la transcripción

El ejemplo mejor estudiado de control positivo en *E. coli* es el efecto de la glucosa en la expresión de genes que codifican las enzimas implicadas en el catabolismo de otros azúcares (incluyendo a la lactosa) utilizados como fuente alternativa de carbono y energía. La glucosa se utiliza de forma preferencial, por lo que mientras está disponible, no se expresan las enzimas implicadas en el catabolismo de fuentes alternativas de energía. Por ejemplo, si se cultiva *E. coli* en un medio que contenga glucosa y lactosa, el operón *lac* no se induce y la bacteria solamente utiliza glucosa. Por tanto, la glucosa reprime el operón *lac* incluso en presencia del inductor normal (lactosa).

Actualmente se sabe que la represión por glucosa (denominada represión catabólica o represión por catabolito) está mediada por un sistema de control positivo que depende de los niveles de AMP cíclico (AMPc) (Fig. 7.9). La enzima adenilato ciclasa, que transforma ATP a AMPc, está regulada en bacterias de tal forma que al descender los niveles de glucosa se activa y aumentan los niveles de AMPc. El AMPc se une a una proteína de regulación transcripcional denominada proteína activadora de genes catabólicos (CAP), lo cual promueve la unión de CAP a una determinada secuencia de ADN, que en el operón *lac* está situada aproximadamente 60 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Posteriormente CAP interacciona con la subunidad α de la ARN polimerasa, facilitando la unión de la polimerasa al promotor y activando la transcripción.

ARN polimerasas eucarióticas y factores de transcripción generales

Pese a que la transcripción se lleva a cabo siguiendo una serie de mecanismos comunes en todas las células, es considerablemente más compleja en células eucarióticas que en bacterias. Esto se refleja en dos diferencias entre los sistemas procariótico y eucariótico. Primero, mientras que en bacterias todos los genes se transcriben por medio de una ARN polimerasa única, las células eucarióticas contienen varias ARN polimerasas distintas que transcriben distintas clases de genes. En segundo lugar, las ARN polimerasas eucarióticas interaccionan con un conjunto de proteínas específicas para iniciar la transcripción. Finalmente, la transcripción en eucariotas tiene lugar sobre la cromatina en lugar de sobre ADN libre, y la regulación de la estructura cromatínica es un factor importante en la actividad transcripcional de los genes eucariotas. La mayor complejidad de la transcripción eucariótica posibilita la sutileza en la regulación de la expresión génica necesaria para dirigir las actividades de los distintos tipos celulares en organismos multicelulares.

ARN polimerasas eucarióticas

Las células eucarióticas contienen tres tipos de ARN polimerasas nucleares que transcriben distintos tipos de genes (Tabla 7.1). Los genes codificadores de proteínas son transcritos por la ARN polimerasa II para dar ARNm. De igual modo, la ARN polimerasa II se encarga de transcribir moléculas de microARN (ARNmi) que desempeñan un papel clave en la regulación de la expresión génica en las células eucarióticas. Los ARN ribosómicos (ARNr) y de transferencia (ARNt) se obtienen por medio de las ARN polimerasas I y III. La ARN polimerasa I está específicamente dirigida a la transcripción de las tres moléculas de mayor tamaño de ARNr, designadas 28S, 18S y 5,8S de acuerdo con sus coeficientes de sedimentación durante la centrifugación. La ARN polimerasa III transcribe los genes codificantes de los ARNt y de las especies más pequeñas de ARNr (5S). Algunos de los ARN pequeños implicados en el empalme y en el transporte de proteínas (ARNsn y ARNsc) también son transcritos por la ARN polimerasa III, mientras que otros son productos de la ARN polimerasa II. Adicionalmente existen ARN polimerasas distintas (similares a las ARN polimerasas bacterianas) en el interior de los cloroplastos y las mitocondrias, donde transcriben de forma específica el ADN de estas organelas.

Las tres ARN polimerasas nucleares son enzimas complejas, que se componen de 12 a 17 subunidades cada una. Pese a que reconocen distintos promotores y transcriben distintas clases de genes, comparten muchas características comunes entre ellas, además de con la ARN polimerasa bacteriana. En concreto, las tres ARN polimerasas eucarióticas contienen nueve subunidades conservadas, cinco de las cuales están relacionadas con las subunidades α, β, β' y ω de la ARN polimerasa bacteriana. La estructura de la ARN polimerasa II de levaduras es muy similar a la de la enzima bacteriana (Fig. 7.10), sugiriendo que todas las ARN polimerasas emplean mecanismos fundamentalmente conservados para transcribir el ADN.

Tabla 7.1 Tipos de genes transcritos por ARN polimerasas eucarióticas

Tipos de ARN sintetizados	ARN polimerasa
Genes nucleares	
ARNm	II
ARNmi	II
ARNt	III
ARNr	
5,8S, 18S, 28S	I
5S	III
ARNsn y ARNsc	II y III[a]
Genes mitocondriales	Mitocondriales[b]
Genes cloroplasmáticos	Cloroplásticos[b]

[a] Algunos ARN nucleares pequeños (sn) y citoplásmicos (sc) se transcriben por la polimerasa II y otros por la polimerasa III.
[b] Las ARN polimeras mitocondriales y de cloroplastos son similares a las enzimas bacterianas.

Factores de transcripción generales e iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II

Dado que la ARN polimerasa II es responsable de la síntesis de ARNm a partir de los genes codificantes de proteínas, ha sido el objetivo de la mayoría de los estudios de transcripción en eucariotas. Los estudios iniciales de esta enzima indicaron que su funcionamiento es diferente de la ARN poli-

Figura 7.10 Estructura de la ARN polimerasa II de levaduras. Las subunidades individuales se diferencian por colores. (De P. D. Kramer y cols., 2001. *Science* 292:1863.)

merasa procariótica. En sistemas eucarióticos no es posible obtener la transcripción fidedigna de genes bacterianos conseguida *in vitro* con la simple adición de ARN polimerasa purificada a un ADN portador de un promotor. El fundamento de esta diferencia fue elucidado en 1979, cuando Robert Roeder y sus colaboradores descubrieron que la ARN polimerasa II solo es capaz de iniciar la transcripción si se añaden proteínas adicionales a la reacción. Por tanto, la transcripción en sistemas eucarióticos precisa de distintos factores de iniciación que (en contraste con la subunidad σ) no forman parte de la polimerasa.

El fraccionamiento bioquímico de extractos nucleares ha llevado a la identificación de proteínas específicas (denominadas **factores de transcripción**) que son necesarias para que la ARN polimerasa II inicie la transcripción. Han sido definidos dos tipos de factores de transcripción. Los **factores de transcripción generales** están implicados en la transcripción en todos los promotores de la polimerasa II y se consideran entonces parte de la maquinaria transcripcional básica. Otros factores transcripcionales (discutidos más adelante en este capítulo) se unen a secuencias de ADN que controlan la expresión de genes individuales y son por tanto responsables de regular la expresión génica. Se estima que aproximadamente el 10% de los genes del genoma humano codifica factores de transcripción, lo que resalta la importancia de estas proteínas.

Los promotores de los genes transcritos por la polimerasa II contienen varias secuencias diferentes junto a los sitios de transcripción (Fig. 7.11). El primer elemento descrito de este grupo era una secuencia semejante a TATAA situada a unos 25-30 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Esta secuencia (denominada **caja TATA**) se parece a la secuencia –10 de los promotores bacterianos y en un primer momento se consideró una característica general de los promotores de todos los genes transcritos por la polimerasa II. No obstante, en los trabajos genómicos más modernos se ha constatado que las secuencias TATA solamente aparecen en el 10%-20% de los promotores de la ARN polimerasa II. Otras secuencias presentes en los promotores de genes transcritos por esta polimerasa son el elemento iniciador (Inr), que abarca el sitio de inicio de la trancripción, los elementos de reconocimiento TFIIB (BRE), localizados corriente arriba de los sitios de inicio de la transcripción, y varios elementos promotores localizados corriente debajo de los sitios de inicio de la transcripción (DPE, DCE y MTE). Los promotores de genes distintos contienen combinaciones diferentes de estos elementos promotores centrales que parecen funcionar de manera conjunta para unirse a factores generales de transcripción.

Se requieren cinco factores generales de transcripción para poner en marcha la transcripción por la ARN polimerasa II en sistemas reconstituidos *in vitro* (véase Fig. 7.11). El primer paso en la formación de un complejo de transcripción consiste en la unión de un factor general de transcripción denominado TFIID al promotor (TF indica factor de transcripción; II indica polimerasa II). TDFIID se compone de varias subunidades, como la **proteína de unión a TATA (TBP)** y otros 14 polipéptidos, denominados **factores asociados a TBP (TAF)**. TBP se une de manera específica a la caja TATA, mientras que otras subunidades lo hacen a las secuencias Inr, DPE, DPC y MTE. La unión de TFIID se sigue del reclutamiento de un segundo factor general de transcripción (TFIIB), que se une a TBP además de a secuencias BRE. A su vez, TFIIB actúa como puente para la ARN polimerasa que se une al complejo TBP-TFIIB junto a un tercer factor, TFIIF.

Tras el reclutamiento de la ARN polimerasa II por el promotor, se precisa de la unión de otros dos factores adicionales (TFIIE y TFIIH) completa la formación del complejo de preiniciación, un modelo molecular que aparece en la Figura 7.12. El TFIIH es un factor con múltiples subunidades que pa-

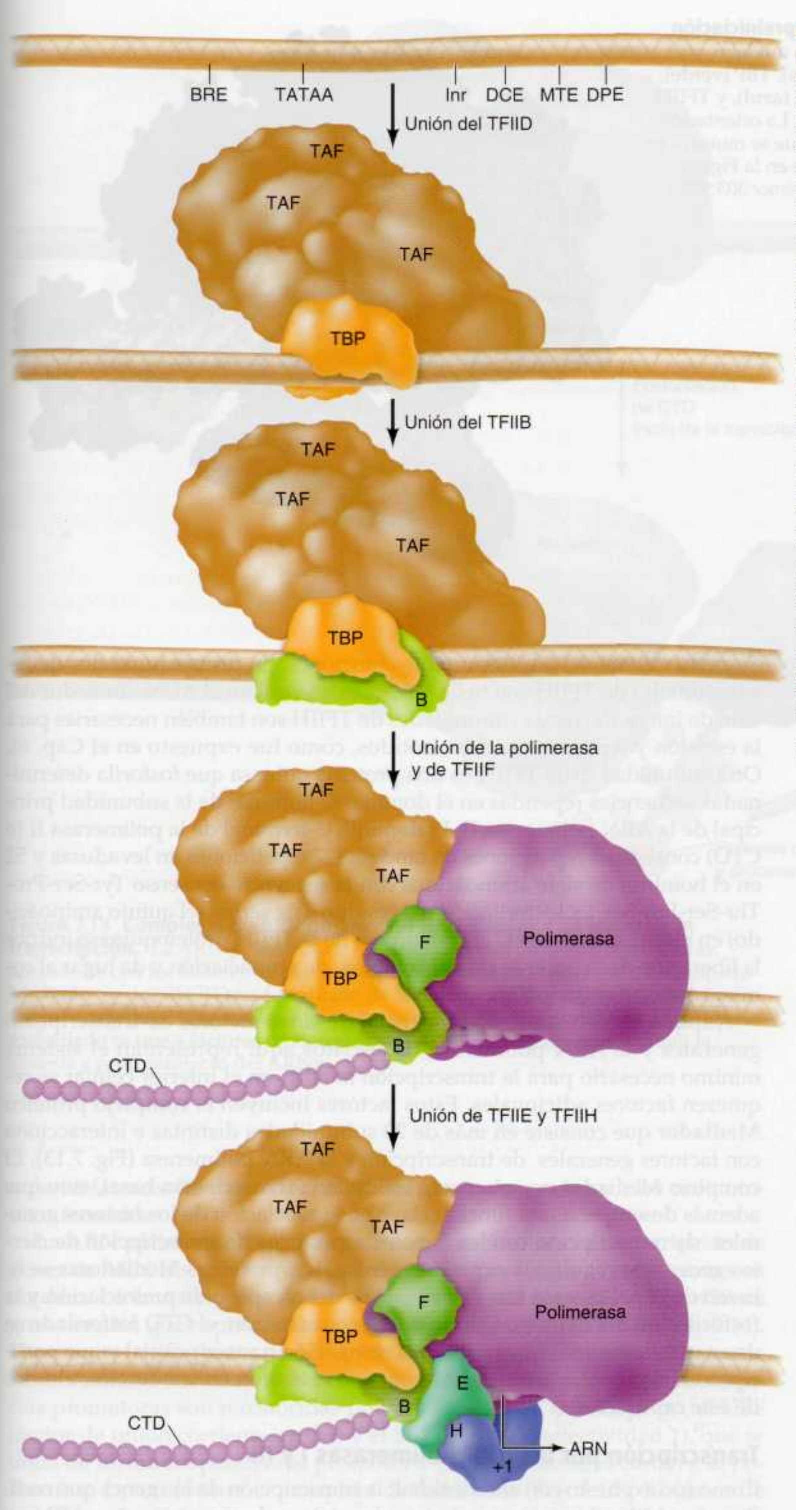


Figura 7.11 Formación de un complejo de preiniciación de la polimerasa II *in vitro*. Entre los elementos de secuencia presentes en los promotores de la polimerasa figuran la caja TATA (secuencia consenso TATAA), situada 25 a 30 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, el elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE), situado unos 35 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, el elemento iniciador (Inr), que abarca el sitio de inicio de la transcripción, y varios elementos localizados corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción (DCE, MTE y DPE). La formación de un complejo de transcripción comienza mediante la unión del factor de transcripción TFIID. Una subunidad de este factor, la proteína de unión a TATA o TBP, se une a la caja TATA; otras subunidades (factores asociados a TBP o TAF) se unen al elemento Inr y elementos de promotores situados corriente abajo. A continuación, TFIIB/B) se une a TBP y a secuencias BRE, lo que se sigue de la elaboración de la unión de la polimerasa asociada a TFIIF(F). Finalmente, las proteínas TFIIF(E) y TFIIF(H) se asocian a este complejo.

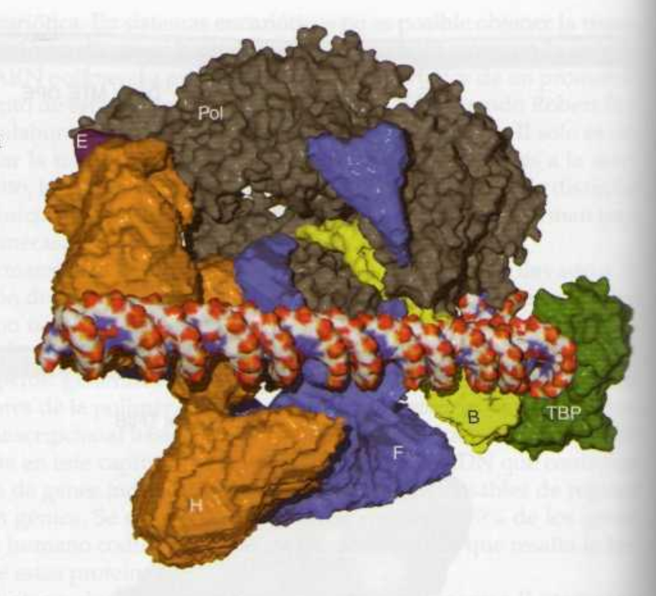


Figura 7.12 Modelo del complejo de preiniciación de la transcripción polimerasa II. Un modelo molecular de la ARN polimerasa II (gris), TBP (verde), TFIIB (amarillo), TFIIE (morado), TFIIF (azul), y TFIIH (beige) ensamblados sobre el promotor. La orientación del complejo de iniciación en el ADN que se muestra en esta imagen es opuesta a la que aparece en la Figura 7.11. (De D. A. Bushnell y cols., 2004. *Science* 303:983.)

rece tener al menos dos importantes funciones. En primer lugar dos de las subunidades de TFIIH son helicasas, que desenrollan el ADN alrededor del sitio de iniciación (estas subunidades de TFIIH son también necesarias para la escisión y reparación de nucleótidos, como fue expuesto en el Cap. 6). Otra subunidad de la TFIIH es una proteína quinasa que fosforila determinadas secuencias repetidas en el dominio C-terminal de la subunidad principal de la ARN polimerasa II. El dominio C-terminal de la polimerasa II (o CTD) consiste en repeticiones en tándem (27 repeticiones en levaduras y 52 en el hombre) de siete aminoácidos con la secuencia consenso Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. La fosforilación del residuo 5 de serina (el quinto aminoácido) en estas repeticiones CTD por acción de la TFIIH proteinquinasa induce la liberación de la polimerasa del complejo de preiniciación y da lugar al comienzo de la transcripción.

Aunque el reclutamiento secuencial de cinco factores de transcripción generales y la ARN polimerasa II descritos aquí representan el sistema mínimo necesario para la transcripción *in vitro*, en el interior celular se requieren factores adicionales. Estos factores incluyen el complejo proteico **Mediador** que consiste en más de 20 subunidades distintas e interacciona con factores generales de transcripción y la ARN polimerasa (Fig. 7.13). El complejo Mediador no solamente estimula la transcripción basal, sino que además desempeña una función clave en la asociación de los factores generales de transcripción con los factores específicos de transcripción de ciertos genes que regulan la expresión génica. Las proteínas Mediadoras se liberan de la polimerasa tras el ensamblaje del complejo de preiniciación y la fosforilación del dominio C-terminal. A continuación, el CTD fosforilado se une a otras proteínas que facilitan la elongación transcripcional y que participan en el procesamiento del ARNm, que se aborda en una sección ulterior de este capítulo.

Transcripción por las ARN polimerasas I y III

Como fue expuesto con anterioridad, la transcripción de los genes que codifican los ARN ribosómicos y de transferencia y algunos pequeños ARN no codificantes en células eucariotas. Las tres clases de ARN polimerasas re-

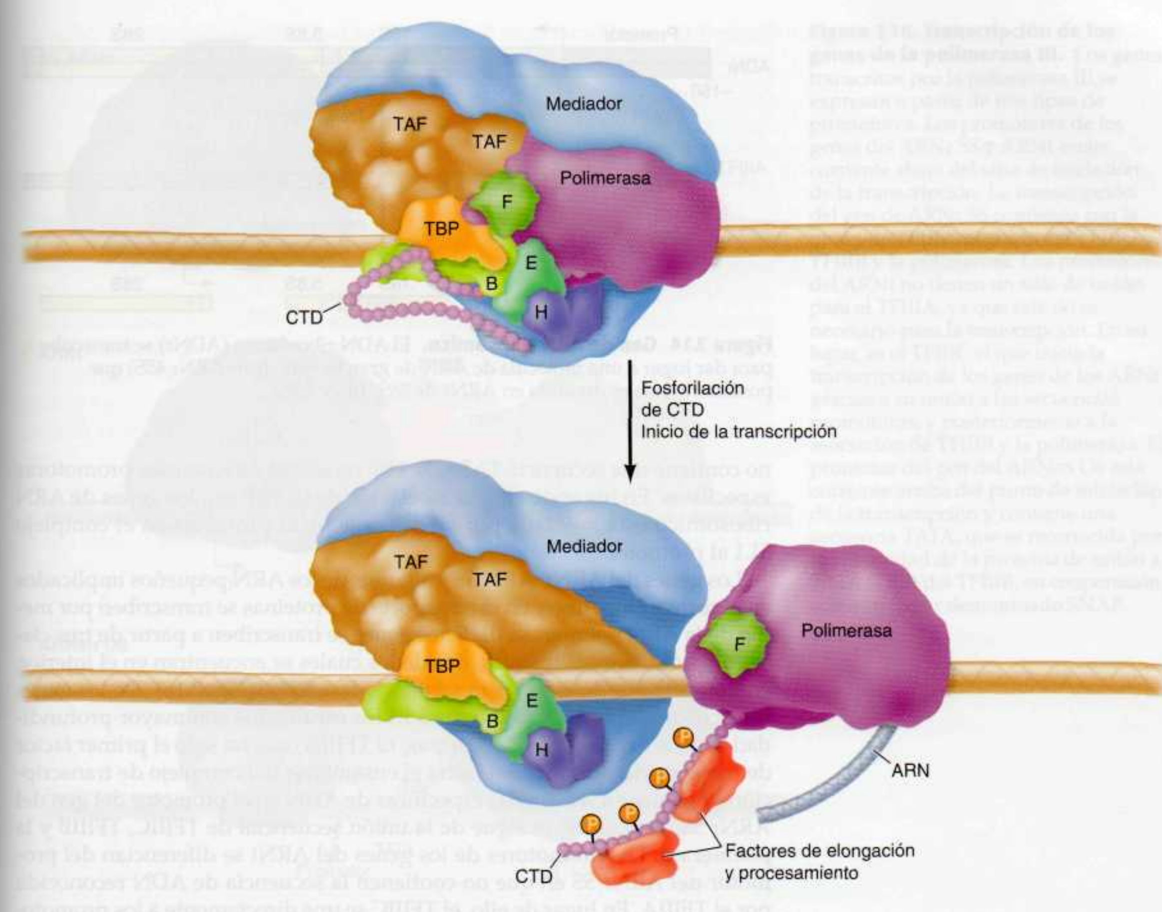


Figura 7.13 Complejos de ARN polimerasa II/Mediador y de inicio de la transcripción. La ARN polimerasa II está asociada con proteínas Mediadoras, además de con los factores de transcripción generales, en el promotor. El complejo Mediador se une al CTD no fosforilado de la polimerasa II, y es liberado tras la fosforilación del CTD cuando se inicia la transcripción. A continuación, el CTD fosforilado se une a factores de elongación y de procesamiento que facilitan la síntesis y procesamiento del ARNm.

quieren factores de transcripción adicionales para asociarse a los promotores adecuados.

La ARN polimerasa I se dedica de forma exclusiva a la transcripción de genes de ARN ribosómico, que están presentes en forma de repeticiones en tándem. La transcripción de estos genes da lugar a un pre-ARNr 45S de gran tamaño, que es procesado para dar los ARNr 28S, 18S y 5,8S (Fig. 7.14). El promotor de los genes de ARN ribosómico se extiende unos 150 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias promotoras son reconocidas por dos factores de transcripción, el UBF (factor de unión corriente-arriba) y el SL1 (factor de selectividad 1), que se unen de forma cooperativa al promotor y posteriormente reclutan a la polimerasa I para formar el complejo de iniciación (Fig. 7.15). El factor de transcripción SL1 se compone de cuatro subunidades proteínicas, una de las cuales es la TBP. Dado que el promotor de los genes de ARN ribosómico

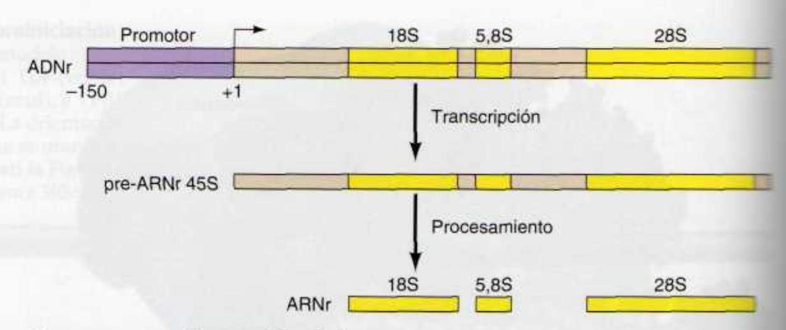


Figura 7.14 Gen de ARN ribosómico. El ADN ribosómico (ADNr) se transcribe para dar lugar a una molécula de ARN de gran tamaño (pre-ARNr 45S) que posteriormente es dividida en ARNr de 28S, 18S y 5,8S.

no contiene una secuencia TATA, la TBP no se une a secuencias promotoras específicas. En lugar de ello, la asociación de la TBP con los genes de ARN ribosómico está mediada por la unión de otras proteínas en el complejo SL1 al promotor.

Los genes del ARNt, ARN 5S y algunos de los ARN pequeños implicados en el corte y empalme y en el transporte de proteínas se transcriben por medio de la ARN polimerasa III. Estos genes se transcriben a partir de tres clases de promotores diferentes, dos de los cuales se encuentran en el interior, en lugar de por delante, de la secuencia transcrita (Fig. 7.16). De los genes transcritos por la ARN polimerasa III los estudiados con mayor profundidad son los del ARNr 5S de *Xenopus*. El TFIIIA (que ha sido el primer factor de transcripción purificado) inicia el ensamblaje del complejo de transcripción uniéndose a secuencias específicas de ADN en el promotor del gen del ARNr 5S. Esta unión se sigue de la unión secuencial de TFIIIC, TFIIIB y la polimerasa. Los promotores de los genes del ARNt se diferencian del promotor del ARNr 5S en que no contienen la secuencia de ADN reconocida por el TFIIIA. En lugar de ello, el TFIIIC se une directamente a los promotores de los genes del ARNt, y atrae al TFIIIB y la polimerasa para formar un complejo de transcripción. Los promotores de la tercera clase de genes transcritos por la polimerasa III, incluyendo los genes que codifican algunos de los ARN pequeños nucleares implicados en el corte y empalme, se localizan por delante del punto de iniciación de la transcripción. Estos promotores contienen una secuencia TATA (como los promotores de algunos genes de la polimerasa II) además de un punto de unión para otro factor, denominado SNAP. SNAP y TFIIIB se unen cooperativamente a estos pro-

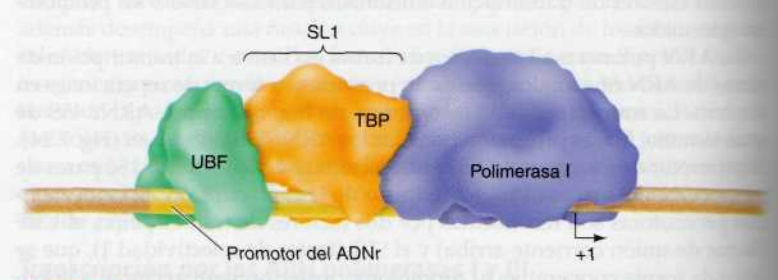


Figura 7.15 Iniciación de la transcripción del ADNr. Dos factores de transcripción, el UBF y el SL1, se unen conjuntamente al promotor ,del ADNr y reclutan a la ARN polimerasa I para formar el complejo de iniciación. Una subunidad del SL1 es la proteína de unión a TATA (TBP).

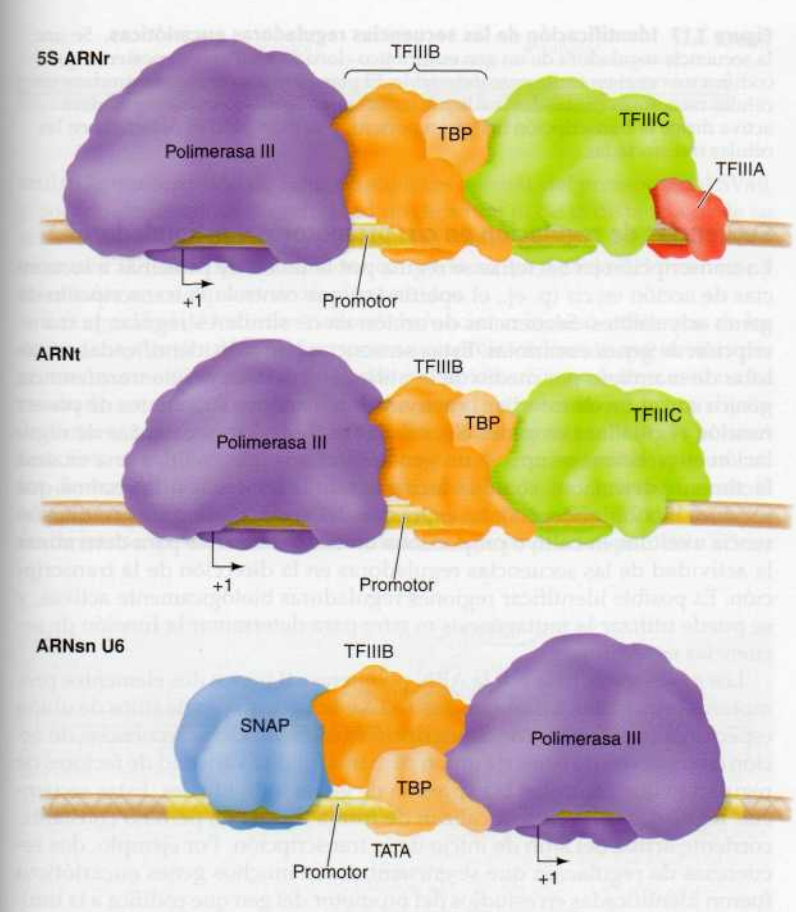


Figura 7.16 Transcripción de los genes de la polimerasa III. Los genes transcritos por la polimerasa III se expresan a partir de tres tipos de promotores. Los promotores de los genes del ARNr 5S y ARNt están corriente abajo del sitio de iniciación de la transcripción. La transcripción del gen de ARNr 5S comienza con la unión de TFIIIA, seguido del TFIIIC, TFIIIB y la polimerasa. Los promotores del ARNt no tienen un sitio de unión para el TFIIIA, ya que éste no es necesario para la transcripción. En su lugar, es el TFIIIC el que inicia la transcripción de los genes de los ARNt gracias a su unión a las secuencias promotoras, y posteriormente a la asociación de TFIIIB y la polimerasa. El promotor del gen del ARNsn U6 está corriente arriba del punto de iniciación de la transcripción y contiene una secuencia TATA, que es reconocida por la subunidad de la proteína de unión a TATA (TBP) del TFIIIB, en cooperación con otro factor denominado SNAP.

motores, y TFIIIB se une directamente a la secuencia TATA. Esto está mediado por una proteína de unión a TATA, TBP, que es una de las subunidades de TFIIIB. Al igual que en el caso de los promotores de otros genes de la ARN polimerasa III, a continuación TFIIIB recluta a la polimerasa al complejo transcripcional.

Regulación de la transcripción en eucariotas

Pese a que el control de la expresión génica es mucho más complejo en eucariotas que en bacterias, se aplican los mismos principios básicos. Al igual que ocurre en las bacterias, la transcripción en las células eucarióticas está controlada por proteínas que se unen a secuencias reguladoras específicas y modulan la actividad de la ARN polimerasa. Una diferencia importante entre la regulación transcripcional en procariotas y eucariotas, sin embargo, resulta del empaquetamiento del ADN eucariótico en cromatina, lo que limita su disponibilidad como molde para la transcripción. Como resultado, las modificaciones de la estructura de la cromatina juegan papeles fundamentales en el control de la transcripción en células eucariotas. Un área especialmente interesante de investigación actual está basado en el descubrimiento de que los ARN no codificantes, además de las proteínas, regulan la transcripción en células eucariotas mediante modificaciones de la estructura cromatínica.

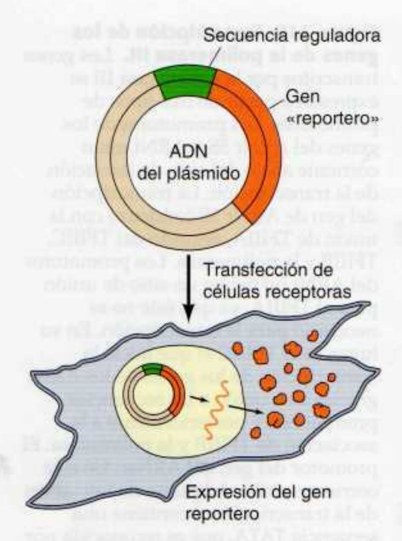


Figura 7.17 Identificación de las secuencias reguladoras eucarióticas. Se une la secuencia reguladora de un gen eucariótico clonado a un gen «reportero» que codifica una enzima fácilmente detectable. El plásmido resultante se introduce en células receptoras cultivadas mediante transfección. Una secuencia reguladora activa dirige la transcripción del gen reportero, y su expresión es detectada en las células transfectadas.

Secuencias de regulación en *cis*: promotores y estimuladores

La transcripción en bacterias se regula por la unión de proteínas a secuencias de acción en *cis* (p. ej., el operón *lac*) que controla la transcripción de genes adyacentes. Secuencias de acción en *cis* similares regulan la transcripción de genes eucariotas. Estas secuencias han sido identificadas en células de mamífero por medio de la utilización de ensayos de transferencia génica con el fin de estudiar la actividad de regiones sugerentes de poseer función reguladora en genes clonados (Fig. 7.17). Las secuencias de regulación eucarióticas se unen a un gen «reportero» que codifica una enzima fácilmente detectable, como la luciferasa de la luciérnaga (la enzima que produce bioluminiscencia). La expresión del gen reportero tras su transferencia a células en cultivo proporciona un ensayo sensible para determinar la actividad de las secuencias reguladoras en la dirección de la transcripción. Es posible identificar regiones reguladoras biológicamente activas, y se puede utilizar la mutagénesis *in vitro* para determinar la función de secuencias específicas.

Los genes transcritos por la ARN polimerasa II tienen dos elementos promotores principales, las secuencias TATA e Inr, que sirven de sitios de unión específicos para factores de transcripción generales. Otras secuencias de acción en *cis* sirven de sitios de unión para una amplia variedad de factores de regulación que controlan la expresión de genes individuales. Estas secuencias reguladoras en *cis* se localizan de forma frecuente, pero no constante, corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Por ejemplo, dos secuencias de regulación que se encuentran en muchos genes eucarióticos fueron identificadas en estudios del promotor del gen que codifica a la timidina quinasa en el virus del herpes simple (Fig. 7.18). Ambas secuencias se localizan a 100 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción: sus secuencias consenso son CCAAT y GGGCGG (llamada secuencia GC, o GC *box*). Actualmente han sido identificadas proteínas específicas que se unen a estas secuencias y estimulan la transcripción.

En contraste con la relativamente simple organización de las secuencias CCAAT y GC en el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes, muchos genes de células eucarióticas están controlados por secuencias de regulación localizadas a mayor distancia (en ocasiones a más de 50 kilobases) del sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias, denominadas **estimuladores** o ***enhancers***, fueron identificadas por primera vez en estudios del promotor de otro virus, el SV40 (Fig. 7.19). Además de una secuencia TATA y un conjunto de seis secuencias GC, para llevar a cabo una transcripción eficiente se requieren dos repeticiones de 72 pares de bases localizadas más lejos corriente arriba. Se observó que estas secuencias esti-

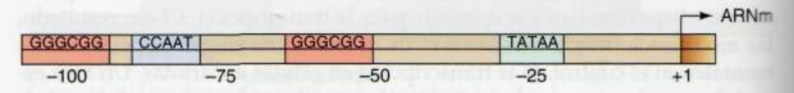


Figura 7.18 Promotor eucariótico. El promotor del gen de la timidina quinasa del virus del herpes simplex contiene tres secuencias corriente arriba de la secuencia TATA, necesarias para una transcripción eficaz: una secuencia CCAAT y dos secuencias GC (secuencia consenso GGGCGG).

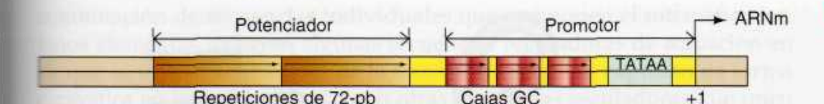


Figura 7.19 Estimulador del SV40. El promotor del SV40 para la expresión génica precoz contiene una secuencia TATA y seis secuencias GC organizadas en tres grupos de secuencias repetidas. Además, para una transcripción eficaz se necesita un potenciador situado hacia arriba en la cadena que consta de dos repeticiones de 72 pares de bases (pb).

mulan la transcripción de otros promotores además del promotor del SV40, y, sorprendentemente, su actividad no depende ni de la distancia ni de su orientación respecto al sitio de inicio de la transcripción (Fig. 7.20). Pueden estimular la transcripción situados corriente arriba o abajo del promotor y orientados en cualquiera de los dos sentidos.

La capacidad de los estimuladores de funcionar incluso a distancia de los sitios de iniciación de la transcripción sugirió inicialmente que actúan por un mecanismo distinto al resto de los promotores. Sin embargo, esto no ha resultado ser cierto: los intensificadores, como los promotores, actúan ligando factores transcripcionales que regulan posteriormente a la ARN polimerasa. Esto es posible porque el ADN forma bucles, que permiten que un factor de transcripción unido a un intensificador lejano interactúe con el complejo ARN polimerasa/Mediador en el promotor (Fig. 7.21). Los factores de transcripción unidos a estimuladores lejanos pueden por tanto actuar

■ **Los potenciadores o *enhancers* pueden funcionar a través de grandes distancias, a veces incluso desde distintos cromosomas. Este proceso, denominado transvección, ha sido mejor estudiado en *Drosophila* e implica la regulación de la expresión de un gen por parte de secuencias potenciadoras *trans*-activadoras presentes en su cromosoma homólogo separado.**

(A) Transcripción basal — P — Gen

(B) Transcripción estimulada — E — Gen

(C) Transcripción estimulada — E — Gen

(D) Transcripción estimulada — Gen — E

(E) Transcripción estimulada — Ǝ — Gen

Figura 7.20 Actuación de los estimuladores. Sin un estimulador, el gen se transcribe a un nivel basal bajo (A). La adición de un estimulador, E —por ejemplo, las repeticiones de 72 pares de bases del SV40— estimula la transcripción. El estimulador es activo no sólo cuando se coloca en la cadena justo por delante del promotor (B), sino también a varias kilobases hacia arriba o hacia abajo del sitio de inicio de transcripción (C y D). Además, los estimuladores son activos orientados en cualquiera de los dos sentidos (E).

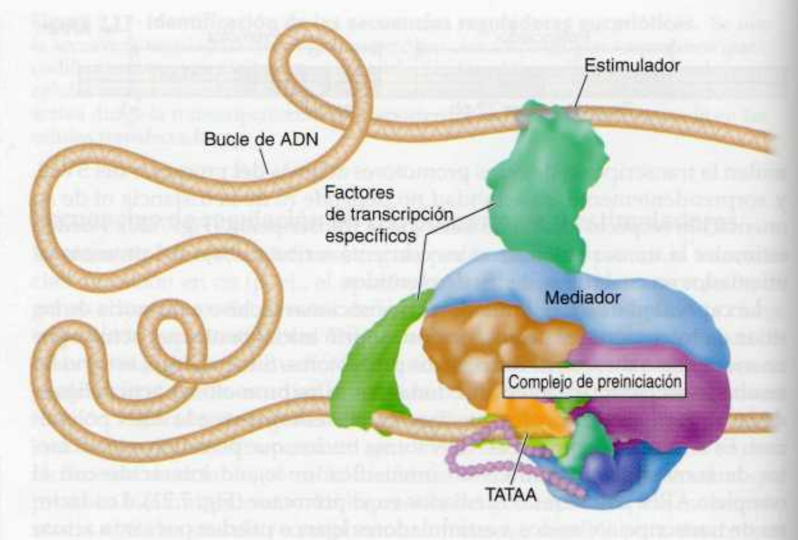


Figura 7.21 Formación de bucles en el ADN. Los factores de transcripción unidos a estimuladores lejanos pueden interaccionar con el complejo ARN polimerasa II/Mediador o los factores de transcripción generales en el promotor gracias a que el ADN es capaz de formar bucles. Por este motivo no existe una diferencia fundamental entre la acción de factores de transcripción unidos al ADN justo por delante del promotor y aquellos estimuladores lejanos.

por el mismo mecanismo que los situados adyacentes a los promotores, por lo que no existe ninguna diferencia fundamental entre las acciones de los intensificadores y las de las secuencias reguladoras en *cis* adyacentes a los sitios de inicio de la transcripción. Es interesante reseñar que aunque los *enhancers* fueron inicialmente identificados en eucariotas, han sido posteriormente encontrados en bacterias —un caso inusual de aplicación de estudios en eucariotas como modelo para sistemas procarióticos.

La unión de proteínas de regulación transcripcional específicas a los estimuladores es responsable del control de la expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación, así como en la respuesta celular a hormonas y factores de crecimiento. Un ejemplo conocido es el estimulador que controla la transcripción de genes de inmunoglobulinas en linfocitos B. Los experimentos de transferencia génica han establecido que el estimulador de las inmunoglobulinas es activo en linfocitos, pero no en otros tipos celulares. Por tanto, esta secuencia reguladora es al menos en parte responsable de la especificidad tisular en la expresión de los genes de inmunoglobulinas en el tipo celular apropiado.

Una característica importante de los estimuladores es que habitualmente contienen múltiples secuencias funcionales que ligan diferentes proteínas de regulación transcripcional. Estas proteínas funcionan de forma conjunta en la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, el estimulador de las cadenas pesadas de inmunoglobulina abarca unos 200 pares de bases y contiene al menos nueve secuencias distintas que sirven de sitio de unión a proteínas (Fig. 7.22). Una mutación en cualquiera de estas secuencias reduce pero no elimina la actividad intensificadora, indicando que las funciones de las proteínas individuales que se unen al intensificador son, al menos en parte, redundantes. Muchas de las secuencias individuales del intensificador de las inmunoglobulinas estimulan por sí mismas la transcripción en células no linfoides. Por tanto la actividad restringida del intensificador intacto en linfocitos B no se debe a que cada uno de sus componentes posea especificidad tisular. La especificidad tisular en la expresión resulta de la



Figura 7.22 Estimulador de la inmunoglobulina. El estimulador de la cadena pesada de la inmunoglobulina abarca unas 200 bases y contiene nueve secuencias funcionales (E, μE1-5, π, μB y OCT) que conjuntamente estimulan la transcripción en linfocitos B.

combinación de secuencias individuales que componen el intensificador. Estos elementos incluyen algunas secuencias reguladoras de actuación en *cis* que se unen a activadores de la transcripción que se expresan de forma específica en linfocitos B, así como otras secuencias reguladoras que unen represores en células no linfoides. Por tanto, el estimulador de las inmunoglobulinas contiene elementos de regulación negativa que inhiben la transcripción en tipos celulares inapropiados, así como elementos de regulación positiva que activan la transcripción en linfocitos B. La actividad conjunta del estimulador es mayor que la suma de sus partes, reflejando la acción combinada de las proteínas asociadas con cada una de sus secuencias individuales.

Aunque la formación de bucles de ADN permite que los *enhancers* actúen a una distancia considerable de los promotores, la actividad de cualquier *enhancer* dado es específica para el promotor de su gen diana correspondiente. Esta especificidad se mantiene gracias a los **aisladores** o **elementos barrera**, que dividen a los cromosomas en dominios independientes e impiden que los *enhancers* actúen sobre promotores localizados en dominios adyacentes. Los aisladores también previenen que se propague la estructura de la cromatina de un dominio a sus vecinos, manteniendo así regiones del genoma reguladas independientemente. Se cree que los aisladores funcionan organizando dominios independientes de cromatina en el interior del núcleo, pero su mecanismo de acción requiere de más investigación para su dilucidación.

Un obstáculo importante para la terapia génica es que los genes introducidos a menudo son regulados de forma aberrante o inactivados como consecuencia de la estructura cromatínica cercana. La adición de elementos aisladores es una potencial solución a este problema.

Sitios de unión para factores de transcripción

Los sitios de unión para las proteínas reguladoras transcripcionales en las secuencias promotoras o potenciadoras se han identificado generalmente mediante dos tipos de experimentos. El primero, *footprinting de ADN* o toma de huellas, se ha descrito anteriormente en relación con la unión de la ARN polimerasa a promotores procariotas (véase Fig. 7.3). La segunda técnica es en el ensayo de **variación de movilidad electroforética** en el que un fragmento de ADN marcado con una sonda radiactiva se incuba con una preparación proteica y es sometido a electroforesis en un gel no desnaturalizante (Fig. 7.23). La unión de las proteínas se detecta como un descenso en

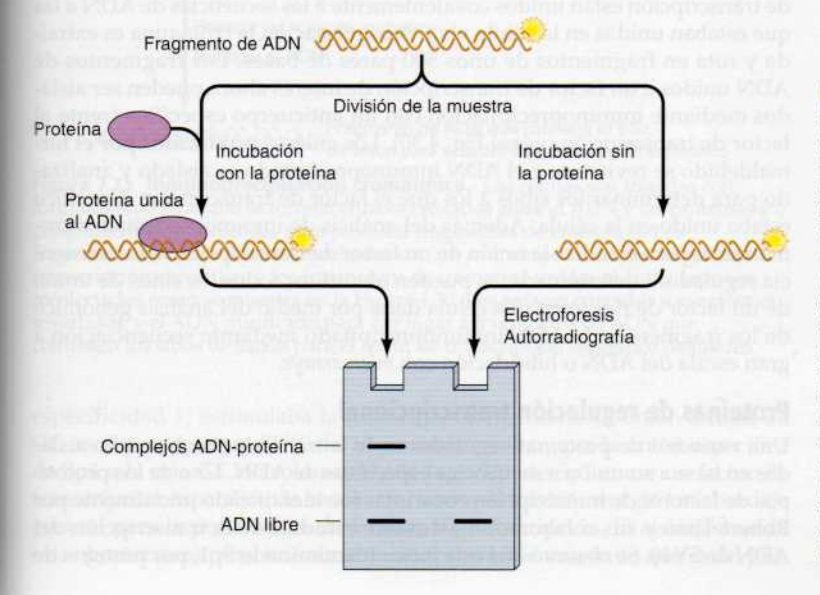


Figura 7.23 Test del cambio en la movilidad electroforética. Se divide en dos una muestra que contiene fragmentos de ADN marcados radiactivamente, y una de las mitades es incubada con una proteína que se une a una secuencia determinada de ADN. Las muestras son posteriormente analizadas mediante electroforesis en un gel no desnaturalizante, de forma que la proteína permanezca unida al ADN. La unión de la proteína se detecta gracias a la migración más lenta de los complejos ADN-proteína comparada con la del ADN libre. Realmente sólo una parte del ADN en la muestra está unido a la proteína, por lo que tanto los complejos de ADN-proteína como el ADN libre se detectan por la incubación del ADN con la proteína.

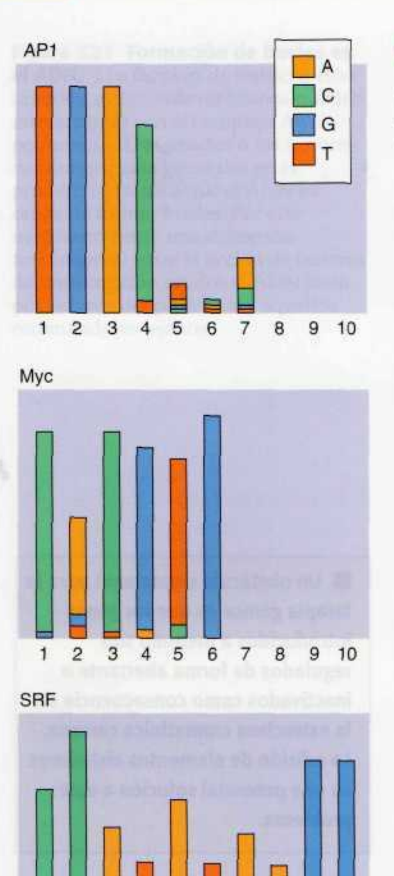


Figura 7.24 *Sitios de unión de los factores de transcripción representativos.* Los sitios de unión de tres factores de transcripción de mamíferos (AP1, Myc y SRF) se muestran como pictogramas en los que la frecuencia de cada nucleótido está representada por la altura de la letra correspondiente en cada posición del sitio de unión.

la movilidad electroforética del fragmento de ADN, puesto que su migración a través del gel se ve ralentizada por la proteína unida. El uso combinado de la toma de huellas y el ensayo de variación de la movilidad electroforética ha permitido correlacionar los sitios de unión de proteínas con los elementos reguladores de los potenciadores y promotores, indicando que estas secuencias generalmente representan sitios de reconocimiento específicos para las proteínas de unión al ADN.

Los sitios de unión para la mayoría de los factores de transcripción consisten en secuencias cotas de ADN, típicamente abarcando 6-10 pares de bases. En la mayoría de los casos, estos sitios de unión son degenerados, lo *que significa que el factor de transcripción se unirá no sólo a la secuencia* consenso sino también a secuencias que difieren del consenso en una o más posiciones. Es por tanto común representar los sitios de unión para factores de transcripción como pictogramas, representando la frecuencia de cada base en todas las posiciones de los sitios de unión conocidos para un factor determinado (Fig. 7.24). Dada su naturaleza corta degeneradas, las secuencias que coinciden con los sitios de unión para factores de transcripción ocurren con frecuencia en el ADN genómico, de modo que las secuencias reguladoras fisiológicamente significativas no pueden ser identificadas a partir de la secuencia de ADN por sí sola. Como se ha descrito en el Capítulo 5, identificar las secuencias reguladoras funcionales en el ADN genómico sigue siendo uno de los retos principales de la bioinformática y la biología de sistemas.

Una técnica experimental importante para la determinación de regiones de ADN que se unen a un factor de transcripción en el interior de la célula, ha sido proporcionado por la **inmunoprecipitación cromatínica** (Fig. 7.25). En primer lugar las células son tratadas con formaldehído, que une a las proteínas al ADN mediante enlaces cruzados. Como resultado, los factores de transcripción están unidos covalentemente a las secuencias de ADN a las que estaban unidas en la célula viva. A continuación la cromatina es extraída y rota en fragmentos de unos 500 pares de bases. Los fragmentos de ADN unidos a un factor de transcripción de interés ahora pueden ser aislados mediante *inmunoprecipitación con un anticuerpo específico frente al* factor de transcripción (véase Fig. 4.30). Los enlaces producidos por el formaldehído se revierten, y el ADN inmunoprecipitado es aislado y analizado para determinar los sitios a los que el factor de transcripción específico estaba unido en la célula. Además del análisis de inmunoprecipitados cromatínicos para estudiar la unión de un factor de transcripción a una secuencia reguladora determinada, se pueden identificar todos los sitios de unión de un factor de riesgo en una célula dada por medio del análisis genómico de los fragmentos de ADN inmunoprecipitado mediante secuenciación a gran escala del ADN o hibridación con *microarrays.*

Proteínas de regulación transcripcional

Una variedad de proteínas reguladoras de la transcripción han sido aisladas en base a su unión a secuencias específicas de ADN. Uno de los prototipos de factores de transcripción eucariotas fue identificado inicialmente por Robert Tjian y sus colaboradores durante estudios de la transcripción del ADN de SV40. Se observó que este factor (denominado Sp1, por proteína de

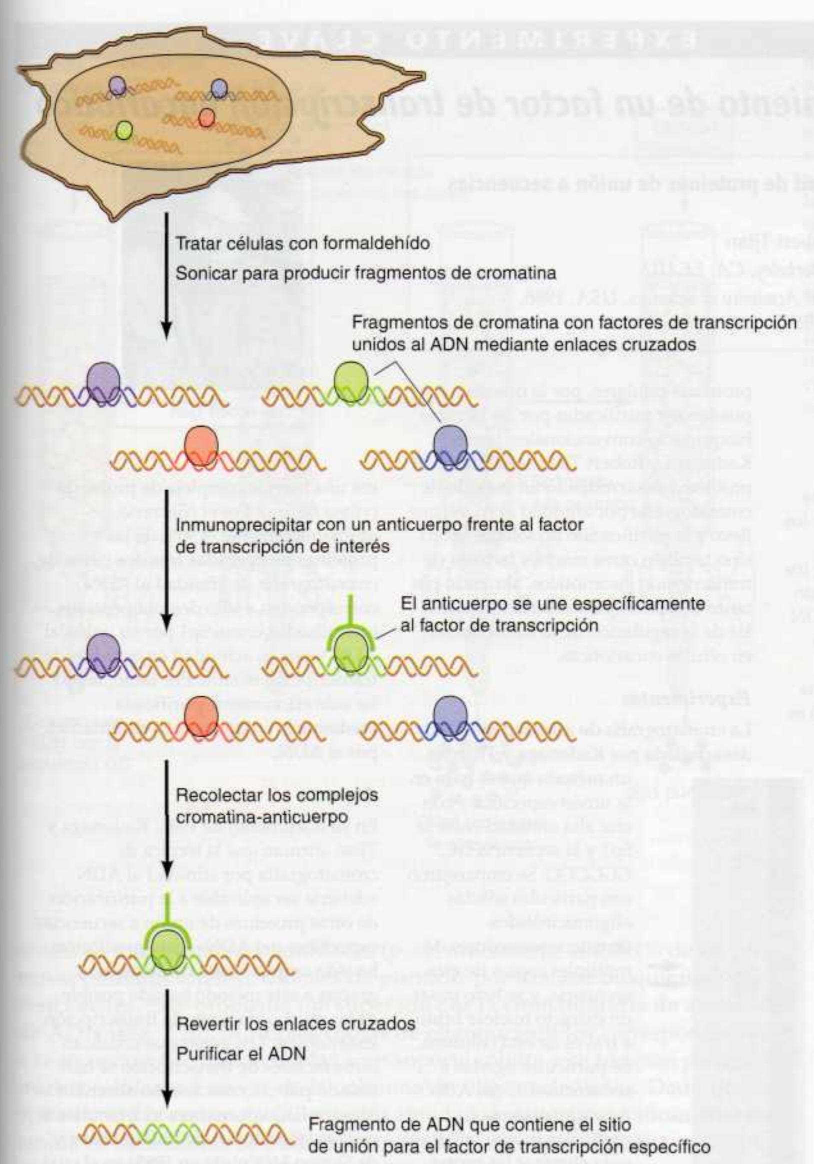


Figura 7.25 Inmunoprecipitación cromatínica. Las células son tratadas con formaldehído para que se formen enlaces cruzados entre el ADN y las proteínas y a continuación son sonicadas para producir fragmentos de cromatina. Los fragmentos de cromatina son incubados con un anticuerpo contra un factor de transcripción específico, y los fragmentos de cromatina unidos al anticuerpo son recolectados como se muestra en la Figura 4.30. Los enlaces cruzados son entonces revertidos, y el ADN purificado para dar lugar a fragmentos de ADN que contienen los sitios de unión para el factor de transcripción específico de interés.

especificidad 1) estimulaba la transcripción mediante su unión a cajas de GC en el promotor de SV40. Es importante resaltar, que la unión específica de Sp1 a la caja GC no sólo estableció la acción de Sp1 como un factor de transcripción específico de secuencia, sino que también surgió un abordaje general para la purificación de factores de transcripción. El aislamiento de estas proteínas supuso inicialmente un formidable reto dado que están pre-



EXPERIMENTO CLAVE

Aislamiento de un factor de transcripción eucariótico

Purificación por afinidad de proteínas de unión a secuencias específicas del ADN

James T. Kadonaga y Robert Tjian
University of California, Berkeley, CA. EE.UU.
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1986, Volumen 83, págs. 5889-5893



Robert Tjian

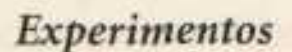
Contexto

Tras los estudios del operón *lac* por Jacob y Monod, quedó claro que la transcripción está regulada por proteínas que se unen a determinadas secuencias de ADN. Un prototipo de los estudios de la expresión génica en células eucarióticas es el del virus de los monos SV40, en el cual se identificaron varias secuencias reguladoras del ADN a principios de la década de 1980. En 1983 William Dynan y Robert Tjian demostraron por primera vez que una de estas secuencias (la secuencia GC) es el sitio de unión específico de una proteína detectable en extractos nucleares de células humanas. Esta proteína (llamada proteína específica 1 o Sp1) no sólo se une a la secuencia GC, sino que también estimula la transcripción *in vitro*, lo que confirma que es un activador de la transcripción específico de secuencia.

Para estudiar el mecanismo de acción de la Sp1 era necesario obtener el factor de transcripción en forma pura así como clonar el gen de la Sp1. Se convirtió así en una prioridad aislar a la Sp1 de forma pura, aunque suponía un reto técnico importante. Tanto la Sp1 como otros factores de transcripción representan tan sólo alrededor del 0,001% del total de las proteínas celulares, por lo que no pueden ser purificadas por las técnicas bioquímicas convencionales. James Kadonaga y Robert Tjian solventaron el problema desarrollando un método de cromatografía por afinidad al ADN, que llevó a la purificación no sólo de la Sp1 sino también otros muchos factores de transcripción eucarióticos, abriendo por tanto el camino para el análisis molecular de la regulación de la transcripción en células eucarióticas.

Experimentos

La cromatografía de afinidad al ADN, desarrollada por Kadonaga y Tjian, es un método que se basa en la unión específica y con una alta afinidad entre la Sp1 y la secuencia GC, GGGCGG. Se emparejaron con partículas sólidas oligonucleótidos sintéticos poseedores de múltiples copias de esta secuencia, y se hizo pasar un extracto nuclear bruto a través de esta columna de partículas ligadas a secuencias GC del ADN. A continuación las partículas fueron lavadas para eliminar las proteínas que no quedaron unidas de manera específica con los oligonucleótidos. Por último, se realizó otro lavado de las partículas con suero salino hipertónico (ClK 0,5M), con el objetivo de separar la Sp1 del ADN y liberar por tanto la Sp1 de la columna.



Purificación de la Sp1. Electroforesis en gel de las proteínas presentes inicialmente en el extracto nuclear bruto (carril 1) y de las proteínas obtenidas tras uno o dos ciclos de cromatografía de afinidad al ADN (carriles 2 y 3, respectivamente). Se indica a la izquierda del gel el tamaño de las proteínas marcadoras de peso molecular (en kilodaltons), y mediante flechas los polipéptidos de la Sp1.

La electroforesis en gel demostró que el extracto nuclear bruto aplicado inicialmente a la columna era una mezcla compleja de proteínas (véase figura). Por el contrario, aproximadamente el 90% de las proteínas recuperadas tras dos ciclos de cromatografía de afinidad al ADN corresponden a sólo dos polipéptidos, identificados como Sp1 por su unión al ADN y por su actividad en estudios de transcripción *in vitro*. Por tanto, la Sp1 ha sido eficazmente purificada mediante la cromatografía de afinidad por el ADN.

Impacto

En su documento de 1986, Kadonaga y Tjian afirman que la técnica de cromatografía por afinidad al ADN «debería ser aplicable a la purificación de otras proteínas de unión a secuencias específicas del ADN». Esta predicción ha sido ampliamente confirmada; y gracias a este método ha sido posible aislar muchos factores de transcripción eucarióticos. Los genes que codifican otros factores de transcripción se han aislado por otro mecanismo alternativo (desarrollado de manera independiente por los laboratorios de Phillip Sharp y de Steven McKnight en 1988) en el cual se revisan las bibliotecas de expresión de ADNc mediante sondas de oligonucleótidos para detectar proteínas recombinantes que se unen específicamente a las secuencias deseadas del ADN. La posibilidad de aislar proteínas de unión a secuencias específicas del ADN por estos métodos ha permitido la descripción detallada de la estructura y el funcionamiento de una amplia variedad de proteínas reguladoras de la transcripción, proporcionando las bases para la actual comprensión de la expresión génica en células eucarióticas.

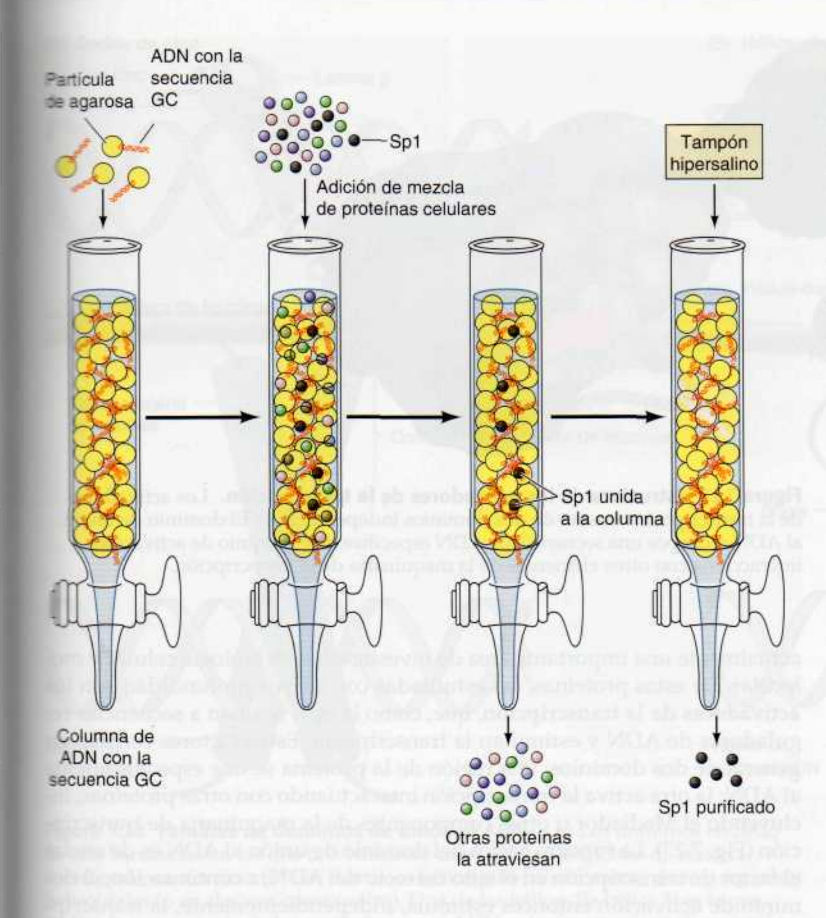


Figura 7.26 Purificación de la Sp1 mediante cromatografía de afinidad por ADN. Se adhieren oligonucleótidos de doble cadena que contienen secuencias repetidas de secuencias GC a partículas de agarosa, y se traspasan a una columna. Se añaden entonces a la columna una mezcla de proteínas celulares con la Sp1; dado que la Sp1 se une de manera específica a los oligonucleótidos con la secuencia GC, es retenida en la columna, mientras que otras proteínas la atraviesan. Tras lavar la columna con un tampón hipersalino se disocian la Sp1 del ADN con la secuencia GC, con lo que se obtiene la proteína Sp1 purificada.

sentes en muy pequeñas cantidades (p. ej., únicamente el 0,001% de las proteínas celulares totales), difíciles de purificar por técnicas bioquímicas convencionales. Este problema fue superado por la **cromatografía de afinidad de ADN** (Fig. 7.26). Múltiples copias de oligonucleótidos correspondientes a la secuencia GC fueron fijadas a un soporte sólido, y se hicieron pasar extractos celulares a través de la columna de oligonucleótidos. Dado que la Sp1 se une a la secuencia GC con alta afinidad, quedaba específicamente retenida en la columna. Se pudo por tanto obtener proteína Sp1 altamente purificada para ser utilizada en estudios posteriores.

La cromatografía de afinidad por ADN, utilizada por primera vez en la purificación de la Sp1, ha sido utilizada con éxito para aislar una amplia variedad de proteínas de unión al ADN con especificidad de secuencia a partir de células eucariotas. Los genes que codifican otros factores de transcripción han sido aislados mediante el análisis de bibliotecas de ADNc de expresión para identificar proteínas recombinantes que se unen a secuencias específicas del ADN. El clonaje y secuenciación de ADNc de factores de transcripción ha llevado a la acumulación de una gran cantidad de información sobre la estructura y función de estas críticas proteínas reguladoras.

Estructura y función de los activadores de la transcripción

Dado que los factores de transcripción son fundamentales para la regulación de la expresión génica, la comprensión de sus mecanismos de acción es

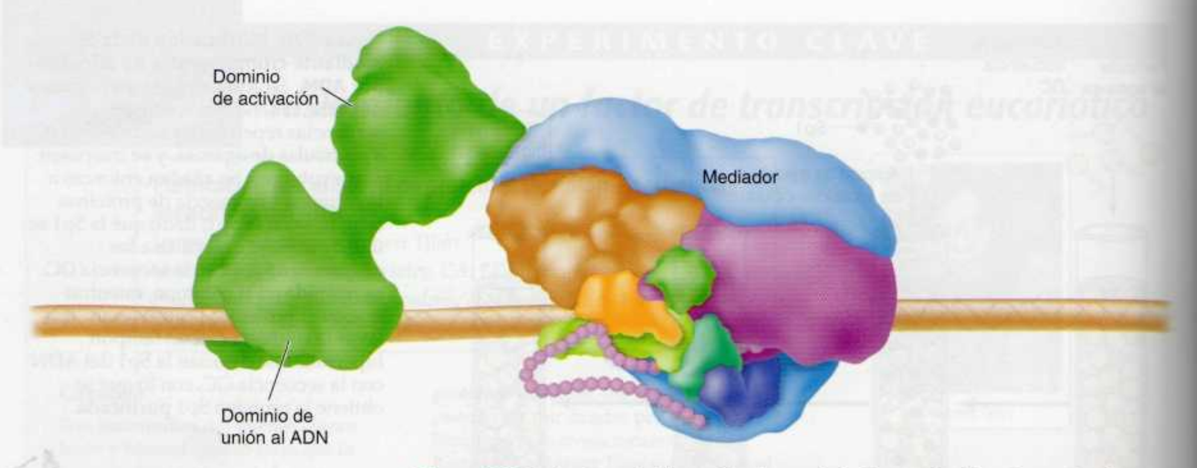


Figura 7.27 Estructura de los activadores de la transcripción. Los activadores de la transcripción constan de dos dominios independientes. El dominio de unión al ADN reconoce una secuencia de ADN específica, y el dominio de activación interacciona con otros elementos de la maquinaria de la transcripción.

actualmente una importante área de investigación en biología celular y molecular. De estas proteínas, las estudiadas con mayor profundidad son los **activadores de la transcripción**, que, como la Sp1, se unen a secuencias reguladoras de ADN y estimulan la transcripción. Estos factores constan en general de dos dominios: una región de la proteína se une específicamente al ADN; la otra activa la transcripción interactuando con otras proteínas, incluyendo el Mediador u otros componentes de la maquinaria de transcripción (Fig. 7.27). La función básica del dominio de unión al ADN es de anclar el factor de transcripción en el sitio correcto del ADN; a continuación, el dominio de activación entonces estimula, independientemente, la transcripción a través de interacciones proteína-proteína.

Actualmente se han identificado muchos factores de transcripción diferentes en células eucariotas, con unos 2.000 codificados por el genoma humano. Contienen distintos tipos de dominios de unión al ADN, algunos de los cuales se ilustran en la Figura 7.28. El más común es el **dominio de dedo de zinc**, que contiene repeticiones cisteína e histidina que ligan iones de cinc y se pliegan en bucles («dedos») que se unen al ADN. Estos dominios fueron inicialmente identificados en el factor de transcripción de la ARN polimerasa III TFIIIA pero se encuentran también en factores de regulación transcripcionales de los promotores de la polimerasa II, incluyendo la Sp1. Otros ejemplos de factores de transcripción que posee dominios en dedos de cinc son los **receptores de hormonas esteroideas**, que regulan la transcripción génica en respuesta a hormonas como los estrógenos y la testosterona.

La estructura **hélice-vuelta-hélice** se describió inicialmente en proteínas de unión al ADN procarióticas, como la proteína activadora de catabolitos (CAP) de *E. coli*. En estas proteínas una hélice realiza la mayor parte del contacto con el ADN, mientras que las otras hélices estabilizan la interacción. En las células eucarióticas un tipo de proteínas con conformación hélice-vuelta-hélice son las proteínas con **homeodominios**, que tienen un papel crítico en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario. Los genes que codifican estas proteínas fueron descubiertos en mutantes *Drosophila*. Algunos de los mutantes de *Drosophila* descritos inicialmente (denominados mutantes homeóticos en 1894) daban lugar al

■ Se han desarrollado factores de transcripción artificiales con dominios en dedo de zinc diseñados para unirse a secuencias específicas del genoma. Ligando diferentes dominios efectores al dominio de unión al ADN, el gen diana puede ser activado o reprimido. Esta tecnología puede aplicarse a la terapia génica y al desarrollo de plantas y animales transgénicos.

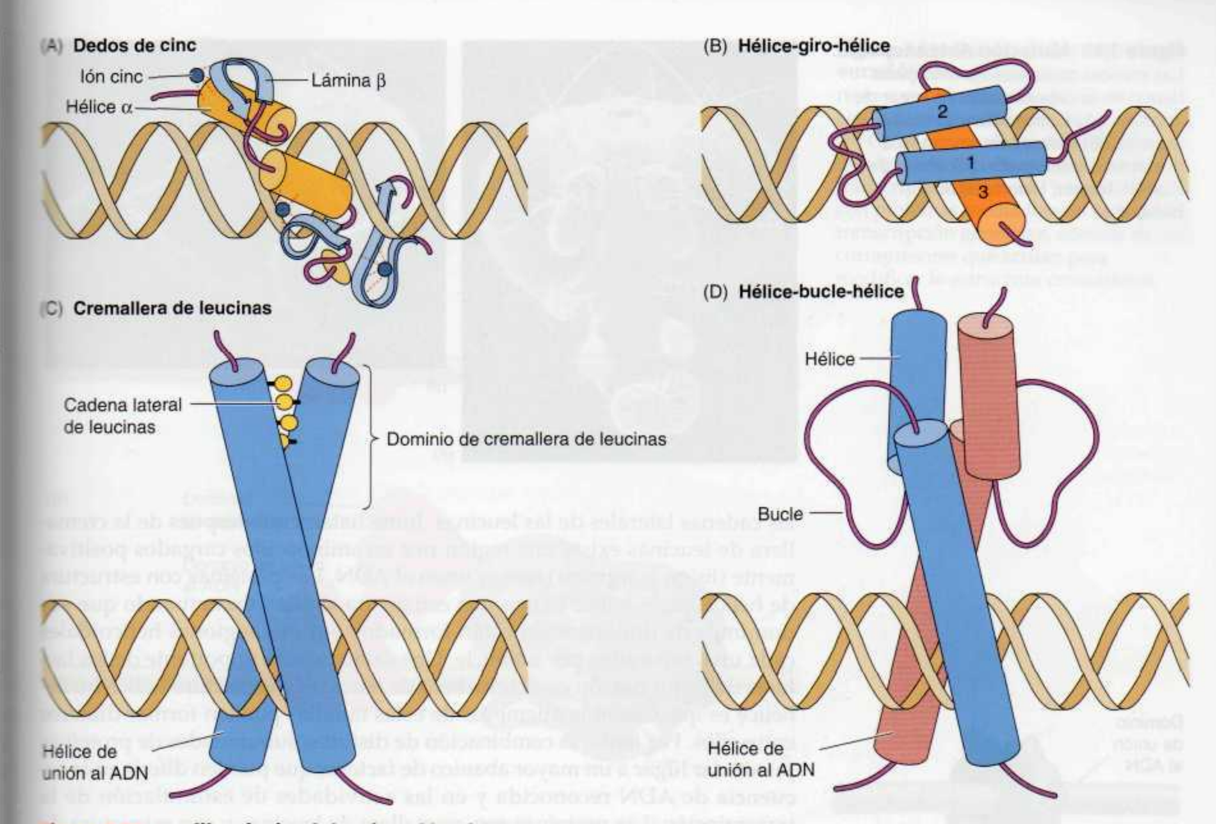
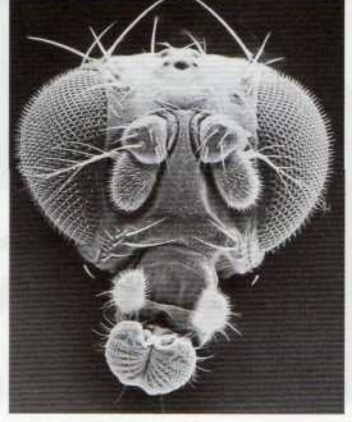


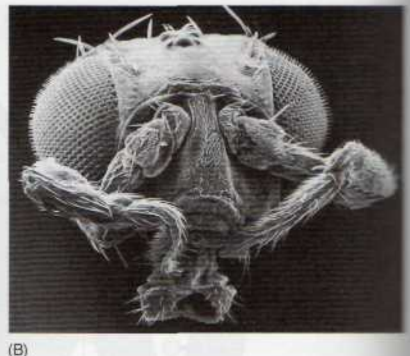
Figura 7.28 Familias de dominios de unión al ADN. (A) Los dominios en dedo de cinc son bucles en los que una hélice α y una lámina β engloban de manera coordinada un ión cinc. (B) Los dominios hélice-giro-hélice constan de tres regiones helicoidales (o en algunos casos cuatro). Una de las hélices (la hélice 3) es la que realiza la mayor parte de los contactos con el ADN, mientras que las hélices 1 y 2 se apoyan encima y estabilizan la interacción. (C) Los dominios de unión al ADN de proteínas con cremallera de leucinas están formados por dos cadenas polipeptídicas distintas. Las responsables de la dimerización son las interacciones entre las cadenas laterales hidrofóbicas de residuos de leucina expuestos en uno de los lados de cada región helicoidal (cremallera de leucinas). Inmediatamente detrás de la cremallera de leucinas está la hélice de unión al ADN, rica en aminoácidos básicos. (D) Los dominios con estructura hélice-bucle-hélice son parecidos a los de cremallera de leucinas, excepto en que los dominios de dimerización de cada una de estas proteínas consisten en dos regiones helicoidales separadas por un bucle.

desarrollo de moscas en las que una parte del cuerpo estaba sustituida por otra. Por ejemplo, en el mutante homeótico *Antennapedia* crecen patas en vez de antenas en la cabeza de la mosca (Fig. 7.29). Desde entonces se ha identificado un amplio abanico de proteínas con homoedominios similares en hongos, plantas y otros animales, incluida la especie humana.

Otras dos familias de proteínas de unión al ADN, las proteínas con **cremallera de leucinas** y con **estructura hélice-bucle-hélice**, contienen dominios de unión al ADN formados por la dimerización de dos cadenas polipeptídicas. La cremallera de leucinas contiene cuatro o cinco residuos de leucina separados por intervalos de siete aminoácidos, quedando sus cadenas laterales hidrofóbicas expuestas en un lado de una región helicoidal. Esta región sirve de dominio de dimerización para las dos subunidades proteínicas, que permanecen unidas por las interacciones hidrofóbicas entre

Figura 7.29 Mutación *Antennapedia*. Las moscas mutantes *Antennapedia* tienen en la cabeza patas en lugar de antenas. (A) Cabeza de una mosca normal. (B) Cabeza de una mosca mutante *Antennapedia*. (Cortesía de F. Rudolf Turner, Universidad de Indiana.)


(A)


(B)

las cadenas laterales de las leucinas. Inmediatamente después de la cremallera de leucinas existe una región rica en aminoácidos cargados positivamente (lisina y arginina) que se unen al ADN. Las proteínas con estructura de hélice-bucle-hélice tienen una estructura similar, exceptuando que sus dominios de dimerización están formados por dos regiones helicoidales cada uno, separados por un bucle. Una característica importante de los factores de transcripción con cremallera de leucinas y estructura hélice-bucle-hélice es que distintos miembros de estas familias pueden formar dímeros entre ellos. Por tanto, la combinación de distintas subunidades de proteínas puede dar lugar a un mayor abanico de factores que pueden diferir en la secuencia de ADN reconocida y en las actividades de estimulación de la transcripción. Las proteínas con cremallera de leucinas y con estructura de hélice-bucle-hélice tienen una importante función en la regulación de la expresión génica inducible con especificidad tisular, y la formación de dímeros entre diferentes miembros de sus familias es un aspecto crucial del control de su función.

Los dominios activadores de los factores de transcripción no están tan bien caracterizados como sus dominios de unión al ADN. Algunos de ellos, denominados dominios de activación acídicos, son ricos en residuos cargados negativamente (aspartato y glutamato); otros son ricos en residuos de prolina o glutamina. Los dominios de activación de los factores de transcripción eucarióticos estimulan la transcripción mediante dos mecanismos diferentes (Fig. 7.30). En primer lugar, interactúan con las proteínas del Mediador y con los factores de transcripción generales, como TFIIB o TFIID, para reclutar la ARN polimerasa y facilitar el ensamblaje de un complejo de transcripción sobre el promotor, similar a los activadores transcripcionales de las bacterias (véase Fig. 7.9). Además, los factores de transcripción eucarióticos interactúan con una variedad de **coactivadores** que estimulan la transcripción modificando la estructura de la cromatina, como se estudia más adelante en este capítulo. También es importante el hecho de que los activadores no solo regulen la iniciación de la transcripción: La elongación del procesamiento del ARN también puede ser regulado, tanto por modulación directa de la actividad de la ARN polimerasa como por los efectos sobre la estructura cromatínica.

Dominio de unión al ADN

Dominio de activación

Interacciones con el mediador y los factores de transcripción generales

Modificación de la estructura de la cromatina

Figura 7.30 Actuación de los activadores transcripcionales. Los activadores eucarióticos estimulan la transcripción por dos mecanismos. 1) Interactúan con las proteínas del Mediador y con los factores de transcripción generales para facilitar el ensamblaje de un complejo de transcripción y estimulan la transcripción,
y 2) interactúan con los coactivadores para facilitar la transcripción modificando la estructura de la cromatina.

Represores eucarióticos

La expresión génica en células eucarióticas está regulada por represores además de por activadores de la transcripción. De igual forma que sus homólogos procarióticos, los represores de eucariotas se unen a secuencias es-

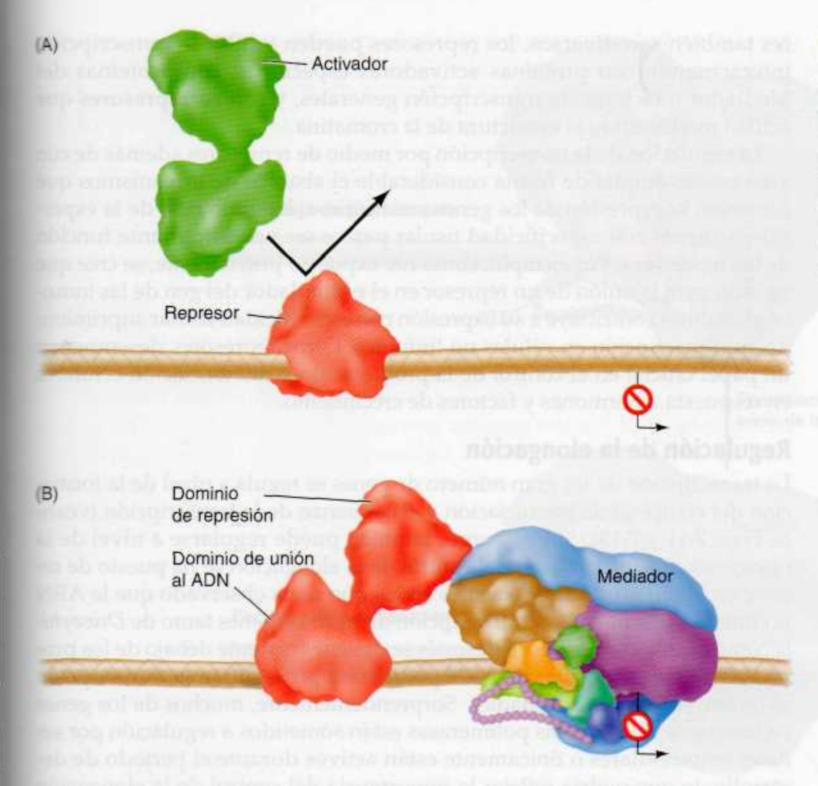


Figura 7.31 Acción de los represores eucarióticos. (A) Determinados represores bloquean la unión de activadores a secuencias reguladoras. (B) Otros represores tienen dominios de represión activos que inhiben la transcripción mediante interacciones con proteínas mediadoras o factores de transcripción generales, además de con correpresores que actúan para modificar la estructura cromatínica.

pecíficas de ADN e inhiben la transcripción. En algunos casos, los represores eucarióticos simplemente interfieren con la unión de otros factores transcripcionales al ADN (Fig. 7.31A). Por ejemplo, la unión de un represor cerca del sitio de iniciación de la transcripción puede bloquear la interacción de la ARN polimerasa o de factores generales de transcripción con el promotor, de forma similar a los represores bacterianos. Otros represores compiten con los activadores por unirse a secuencias específicas de regulación. Algunos de estos represores contienen el mismo dominio de unión al ADN que el activador, pero carecen de su dominio activador. El resultado de su unión al promotor o al estimulador es el bloqueo de la unión del activador, inhibiendo por tanto la transcripción.

En contraste con los represores que simplemente interfieren con la unión de activadores, muchos represores (denominados represores activos) contienen dominios específicos que inhiben la transcripción por medio de interacciones proteína-proteína (Fig. 7.31B). El primero de estos represores fue descrito en 1990 en estudios sobre un gen denominado *Krüppel*, que interviene en el desarrollo embrionario de *Drosophila*. El análisis molecular de la proteína Krüppel ha demostrado que contiene un dominio de represión enlazado a un dominio con estructura de dedos de cinc de unión al ADN, lo que inhibe la transcripción vía interacciones proteína-proteína.

Muchos de los represores activos encontrados tienen una función clave en la regulación de la transcripción de células animales, siendo en ocasiones los reguladores principales del crecimiento y la diferenciación celulares. Al igual que en el caso de los activadores de la transcripción, se han identificado diversos dominios represores. Por ejemplo, el dominio represor de Krüppel es rico en residuos de alanina, mientras que otros dominios represores son ricos en prolina o residuos acídicos. Los objetivos de los represo-

res también son diversos, los represores pueden inhibir la transcripción interactuando con proteínas activadoras específicas, con proteínas del Mediador o factores de transcripción generales, y con **correpresores** que actúan modificando la estructura de la cromatina.

La regulación de la transcripción por medio de represores además de con activadores amplía de forma considerable el abanico de mecanismos que controlan la expresión de los genes eucarióticos. La inhibición de la expresión de genes con especificidad tisular parece ser una importante función de los represores. Por ejemplo, como fue expuesto previamente, se cree que un sitio para la unión de un represor en el estimulador del gen de las inmunoglobulinas contribuye a su expresión con especificidad tisular suprimiendo su transcripción en células no linfoides. Otros represores desempeñan un papel crucial en el control de la proliferación y diferenciación celulares en respuesta a hormonas y factores de crecimiento.

Regulación de la elongación

La transcripción de un gran número de genes se regula a nivel de la formación del complejo de preiniciación y el comienzo de la transcripción (véanse Figs. 7.11 y 7.13). Sin embargo, también puede regularse a nivel de la elongación. La importancia del control de la elongación se ha puesto de relieve en algunos estudios recientes en los que se ha observado que la ARN polimerasa II comienza la transcripción de muchos genes tanto de *Drosophila* como humanos, pero poco después se detiene corriente debajo de los promotores. Estas moléculas de ARN polimerasa proseguirán la transcripción al recibir las señales adecuadas. Sorprendentemente, muchos de los genes en los que se detienen las polimerasas están sometidos a regulación por señales extracelulares o únicamente están activos durante el periodo de desarrollo, lo que podría reflejar la importancia del control de la elongación transcripcional durante el desarrollo y la diferenciación.

La transcripción mediada por la ARN polimerasa II se pone en marcha tras la fosforilación de la serina-5 del CTD por acción de la TFIIH proteinquinasa (Fig. 7.32). Tras el comienzo de la transcripción, la polimerasa sintetiza una secuencia corta de ARN y enseguida se detiene en un sitio cercano al comienzo del gen, habitualmente a unos 50 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción. La parada de la polimerasa en este sitio obedece a la asociación de factores reguladores negativos, como NELF (factor de elongación negativo) y DSIF, que impiden la continuación de la transcripción. La reanudación de este proceso depende de la acción de otro factor, conocido como P-TEFb (factor de elongación de la transcripción positivo-b). El factor P-TEFb contiene una proteínquinasa que fosforila a los factores NELF y DSIF, además de la serina-2 del CTD de la ARN polimerasa, lo que pone en marcha de nuevo la elongación productiva y la asociación de otros factores de elongación y procesamiento al CTD.

Se cree que el reclutamiento de P-TEFb constituye el principal paso en la regulación de la elongación y, al menos, algunos activadores transcripcionales se asociarían a esta molécula para incorporarla a los promotores. No obstante, los mecanismos que controlan la elongación constituyen un aspecto novedoso y poco estudiado de la regulación transcripcional.

Relación entre la estructura cromatínica y la transcripción

Tal y como se mencionó en la exposición previa, tanto los activadores como los represores regulan la transcripción en eucariotas no sólo interaccionando con Mediador y otros componentes de la maquinaria transcripcional, sino también induciendo cambios en la estructura de la cromatina. En lugar de estar presente en el interior del núcleo como el ADN desnudo, el ADN de todas las células eucarióticas se encuentra fuertemente unido a las histo-

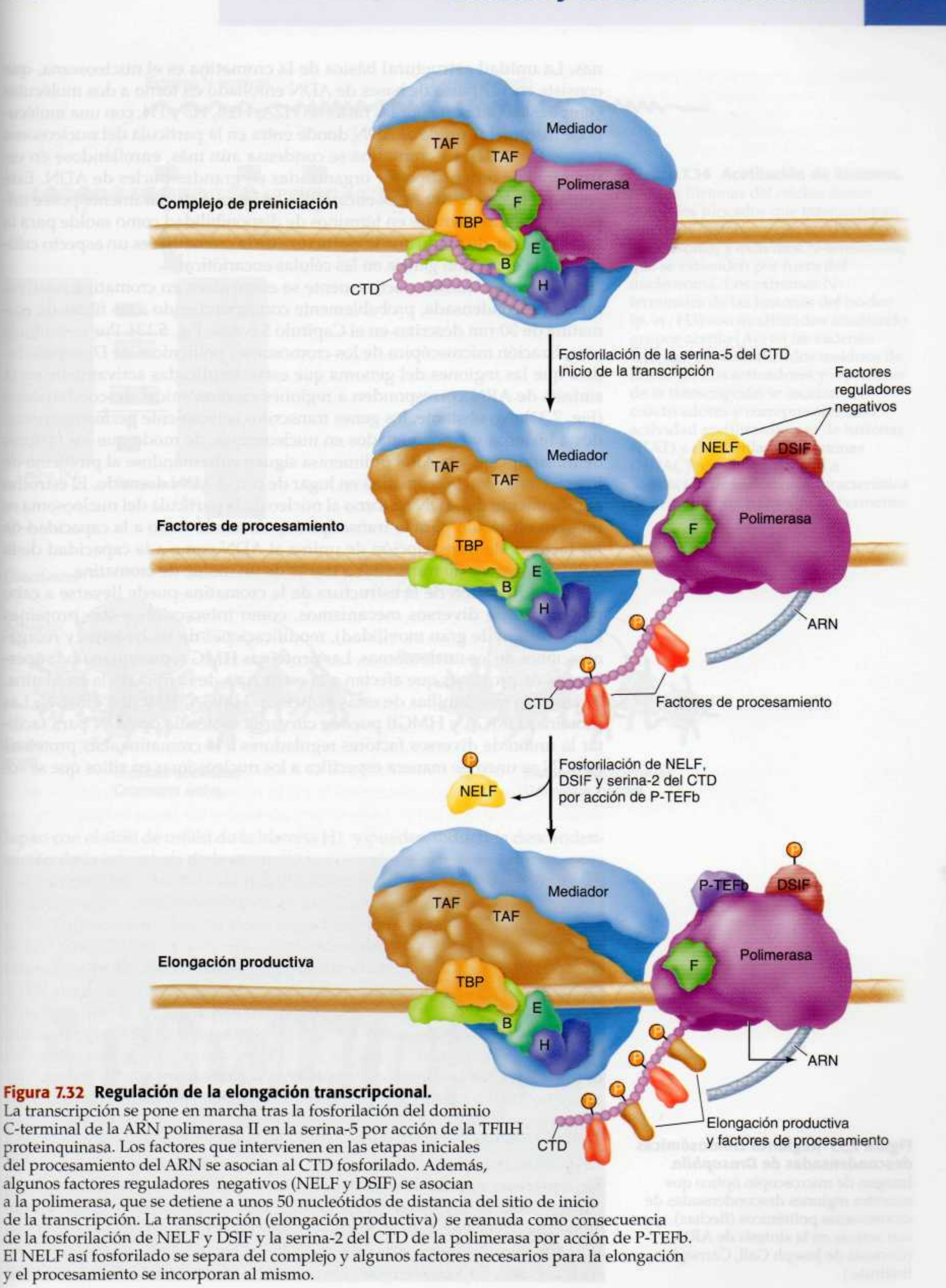


Figura 7.32 Regulación de la elongación transcripcional. La transcripción se pone en marcha tras la fosforilación del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II en la serina-5 por acción de la TFIIH proteinquinasa. Los factores que intervienen en las etapas iniciales del procesamiento del ARN se asocian al CTD fosforilado. Además, algunos factores reguladores negativos (NELF y DSIF) se asocian a la polimerasa, que se detiene a unos 50 nucleótidos de distancia del sitio de inicio de la transcripción. La transcripción (elongación productiva) se reanuda como consecuencia de la fosforilación de NELF y DSIF y la serina-2 del CTD de la polimerasa por acción de P-TEFb. El NELF así fosforilado se separa del complejo y algunos factores necesarios para la elongación y el procesamiento se incorporan al mismo.

nas. La unidad estructural básica de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en 147 pares de bases de ADN enrollado en torno a dos moléculas compuestas cada una por las histonas H2A, H2B, H3 y H4, con una molécula de histona H1 unida al ADN donde entra en la partícula del nucleosoma (véase Fig. 5.12). La cromatina se condensa aún más, enrollándose en estructuras de orden superior organizadas en grandes bucles de ADN. Este empaquetamiento del ADN eucariótico en cromatina claramente posee importantes consecuencias en términos de disponibilidad como molde para la transcripción, de modo que la estructura de la cromatina es un aspecto crítico para la expresión génica en las células eucarióticas.

Los genes transcritos activamente se encuentran en cromatina relativamente descondensada, probablemente correspondiendo a las fibras de cromatina de 30-nm descritas en el Capítulo 5 (véase Fig. 5.13). Por ejemplo, la visualización microscópica de los cromosomas politénicos de *Drosophila* indica que las regiones del genoma que están implicadas activamente en la síntesis de ARN corresponden a regiones cromosómicas descondensadas (Fig. 7.33). No obstante, los genes transcritos activamente permanecen unidos a histonas y empaquetados en nucleosomas, de modo que los factores de transcripción y la ARN polimerasa siguen enfrentándose al problema de interaccionar con la cromatina en lugar de con el ADN desnudo. El estrecho enrollamiento del ADN en torno al núcleo de la partícula del nucleosoma es un gran obstáculo para la transcripción, afectando tanto a la capacidad de los factores de transcripción de unirse al ADN como a la capacidad de la ARN polimerasa de transcribir a través de un molde de cromatina.

La modificación de la estructura de la cromatina puede llevarse a cabo por medio de diversos mecanismos, como interacciones con proteínas HMG (grupo de gran movilidad), modificaciones de las histonas y reorganizaciones de los nucleosomas. Las **proteínas HMG** representan una superfamilia de proteínas que afectan a la estructura de la fibra de la cromatina. Se conocen tres familias de estas proteínas: HMGA, HMGB y HMGN. Las proteínas HMGA y HMGB pueden curvar la molécula de ADN para facilitar la unión de diversos factores reguladores a la cromatina. Las proteínas HMGN se unen de manera específica a los nucleosomas en sitios que se so-

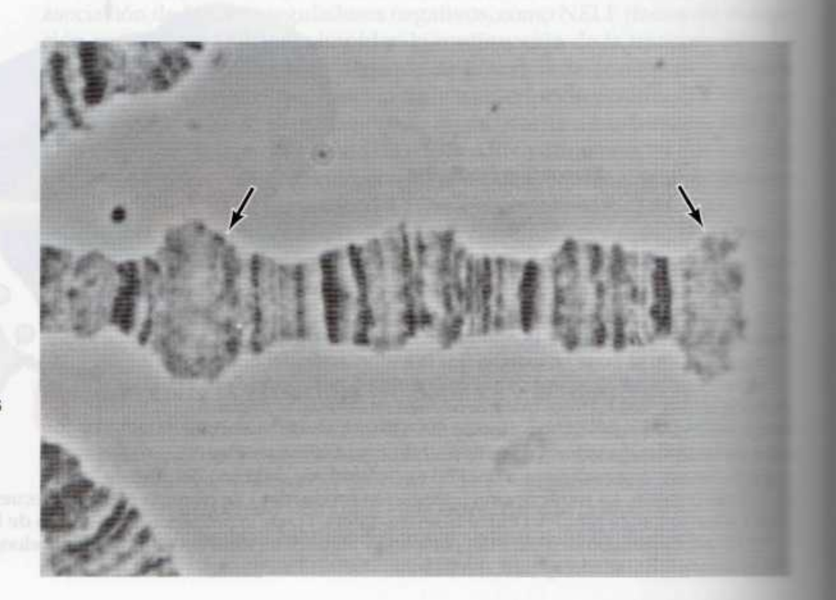


Figura 7.33 Regiones cromosómicas descondensadas de *Drosophila*. Imagen de microscopio óptico que muestra regiones descondensadas de cromosomas politénicos (flechas), que son activas en la síntesis de ARN. (Cortesía de Joseph Gall, Carnegie Institute.)

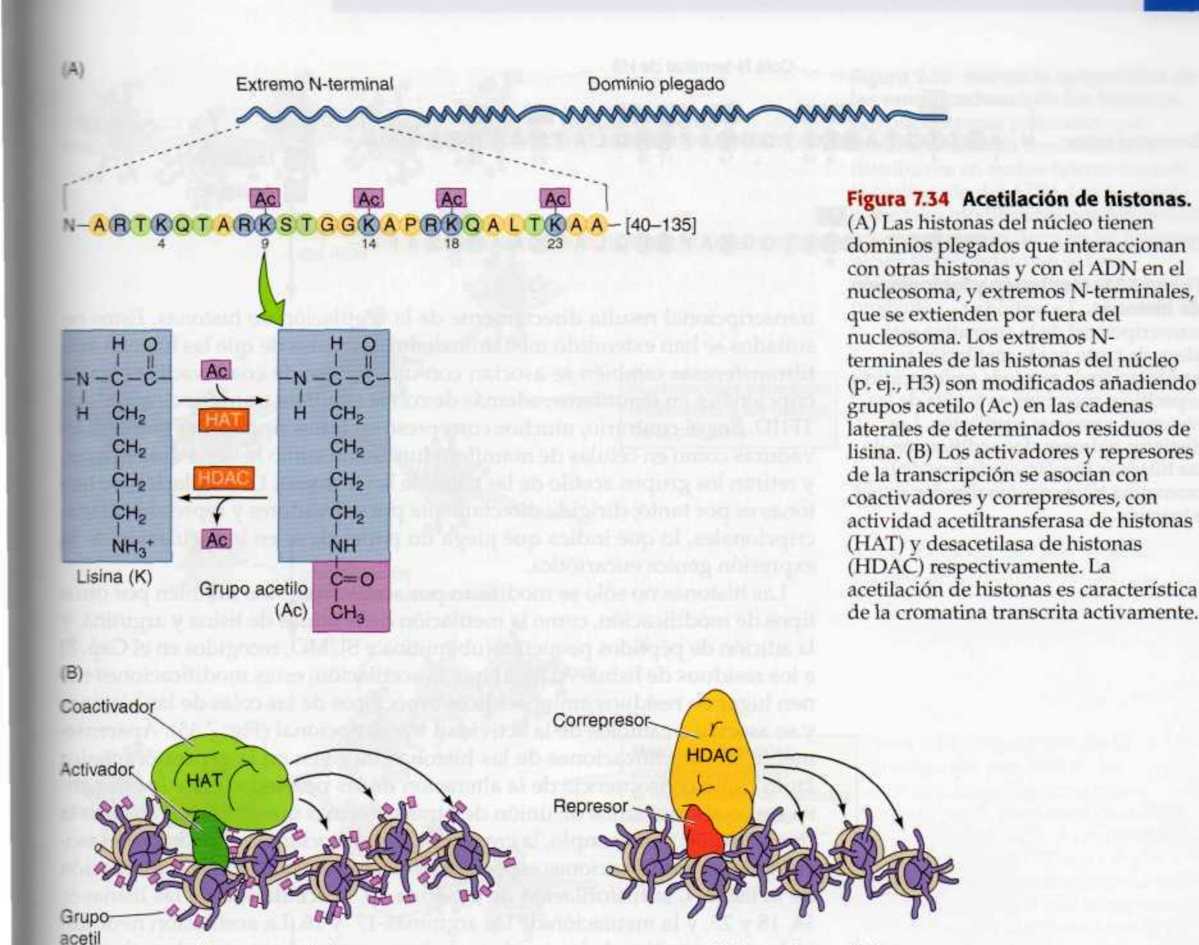


Figura 7.34 Acetilación de histonas. (A) Las histonas del núcleo tienen dominios plegados que interaccionan con otras histonas y con el ADN en el nucleosoma, y extremos N-terminales, que se extienden por fuera del nucleosoma. Los extremos N-terminales de las histonas del núcleo (p. ej., H3) son modificados añadiendo grupos acetilo (Ac) en las cadenas laterales de determinados residuos de lisina. (B) Los activadores y represores de la transcripción se asocian con coactivadores y correpresores, con actividad acetiltransferasa de histonas (HAT) y desacetilasa de histonas (HDAC) respectivamente. La acetilación de histonas es característica de la cromatina transcrita activamente.

lapan con el sitio de unión de la histona H1 y pueden inducir la descondensación de la estructura de la cromatina.

El primer tipo descrito de modificación de histonas, **acetilación de las histonas** se ha correlacionado con la cromatina transcripcionalmente activa en una amplia variedad de tipos celulares (Fig. 7.34). Las histonas del núcleo (H2A, H2B, H3 y H4) tienen dos dominios: un dominio plegado, que interviene en las interacciones con otras histonas y en el enrollamiento del ADN alrededor del núcleo del nucleosoma, y un dominio o extremo amino-terminal, que se extiende por fuera del nucleosoma. El extremo amino-terminal es rico en lisina y puede ser modificado por acetilación en residuos de lisina específicos.

Estudios de dos grupos de investigadores en 1996 proporcionaron vínculos directos entre la acetilación de las histonas y la regulación transcripcional, demostrando que los activadores y represores transcripcionales están asociados con histona acetiltransferasas y deacetilasas, respectivamente. Esta asociación se descubrió en primer lugar mediante la clonación de un gen que codificaba una histona acetiltransferasa de *Tetrahymena*. Sorprendentemente, la secuencia de esta histona acetiltransferasa estaba estrechamente relacionada con un coactivador transcripcional de levaduras previamente conocido. Más experimentos demostraron que la propia Gcn5p posee actividad histona acetiltransferasa, sugiriendo que la activación

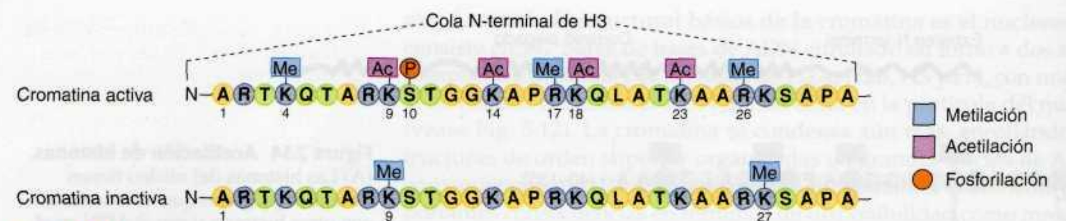


Figura 7.35 Metilación y fosforilación de histonas. La actividad transcripcional de la cromatina está afectada tanto por la metilación y fosforilación de residuos aminoacídicos específicos presentes en la cola de las histonas, como por acetilación. Los distintos patrones de modificación de las histonas son característicos de la cromatina transcripcionalmente activa e inactiva.

transcripcional resulta directamente de la acetilación de histonas. Estos resultados se han extendido mediante demostraciones de que las histona acetiltransferasas también se asocian con un número de coactivadores transcripcionales en mamíferos, además de con el factor de transcripción general TFIID. Por el contrario, muchos correpresores transcripcionales tanto en levaduras como en células de mamífero funcionan como histona deacetilasas, y retiran los grupos acetilo de las colas de las histonas. La acetilación de histonas es por tanto, dirigida directamente por activadores y represores transcripcionales, lo que indica que juega un papel clave en la regulación de la expresión génica eucariótica.

Las histonas no sólo se modifican por acetilación, sino también por otros tipos de modificación, como la metilación de residuos de lisina y arginina, y la adición de péptidos pequeños (ubiquitina y SUMO, recogidos en el Cap. 8) a los residuos de lisina. Al igual que la acetilación, estas modificaciones tienen lugar en residuos aminoacídicos específicos de las colas de las histonas y se asocian a cambios de la actividad transcripcional (Fig. 7.35). Aparentemente, las modificaciones de las histonas influyen en la expresión génica tanto como consecuencia de la alteración de las propiedades de la cromatina como al crear sitios de unión de otras proteínas que activan o inhiben la transcripción. Por ejemplo, la cromatina transcripcionalmente activa se asocia a varias modificaciones específicas de la histona H3, como la metilación de la lisina-4, la fosforilación de la serina-10, la acetilación de las lisinas-9, 14, 18 y 23, y la metilación de las argininas-17 y 26. La acetilación neutraliza la carga positiva de los residuos de lisina y parece potenciar la activación transcripcional como consecuencia de la relajación de la estructura de la cromatina. Por otra parte, los residuos acetilados de lisina actúan como sitios de unión de muchos otros factores activadores de la transcripción. Otras proteínas que activan la transcripción se unen a residuos metilados de lisina-4. Por el contrario, la metilación de las lisinas 9 y 27 se asocia a represión y condensación de la cromatina. Las enzimas que mutilan estos residuos de lisina son reclutadas hacia los genes diana por moléculas correpresoras. A continuación, los residuos de lisina 9 y 27 de H3 actúan como sitios de unión de proteínas que inducen la condensación de la cromatina, lo que vincula directamente esta modificación de una histona con la represión transcripcional y la formación de heterocromatina.

Cabe destacar que estas modificaciones de la colas de histona también se regulan entre sí, lo que da lugar a distintos patrones de modificación de histonas. Por ejemplo, la fosforilación de la serina-10 de H3 (que se relaciona con activación transcripcional) induce la acetilación de la lisina-14 (también asociada a activación), pero inhibe la metilación de la lisina-19 (que se vincula con represión). Por tanto, la fosforilación de la serina-10 de esta histona induce otras modificaciones características de la cromatina transcripcionalmente activa. Por el contrario, la proteína que se une a los residuos metilados de lisina-9 se asocia con actividad de desacetilación de histonas, lo que favorece la condensación de la cromatina y la represión transcripcional.

Las histonas modificadas actúan como sitios de unión de proteínas que introducen cambios en otras histonas, por lo que la modificación de las his-

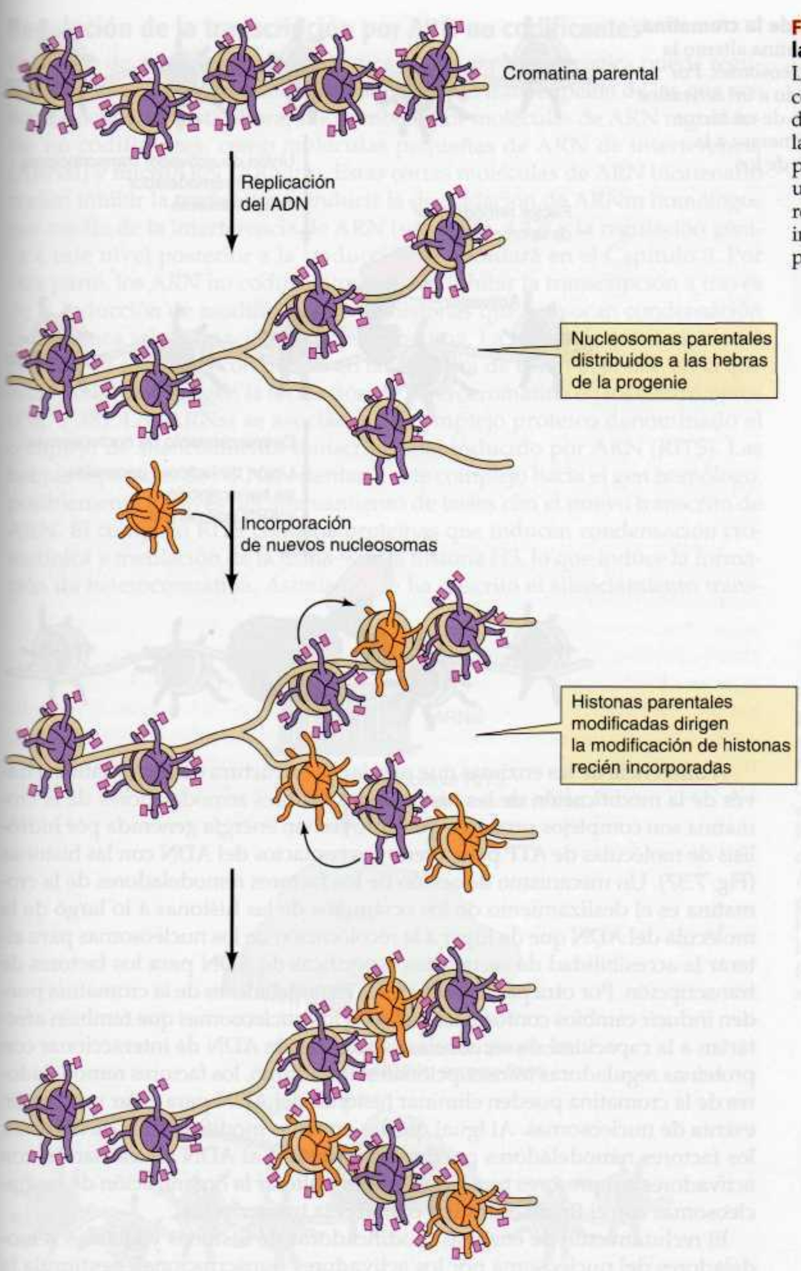


Figura 7.36 Herencia epigenética de las modificaciones de las histonas. Los nucleosomas parentales, que contienen histonas modificadas, se distribuyen en ambas hebras durante la replicación del ADN. Las histonas parentales modificadas pueden inducir unos cambios similares en las histonas recién sintetizadas que se han incorporado a los cromosomas de la progenie.

tonas representa un mecanismo de **herencia epigenética** —la transmisión de información que no forma parte de la secuencia del ADN en la división celular—. Como se ha señalado en el Capítulo 5, los nucleosomas parentales se distribuyen entre las dos hebras hijas durante la replicación del ADN cromosómico. Por consiguiente, las histonas modificadas pasan de los cromosomas parentales a los cromosomas hijos (Fig. 7.36). A continuación, estas histonas modificadas pueden dirigir otras modificaciones similares de histonas recién sintetizadas, lo que da lugar al mantenimiento de un patrón de modificación de histonas característico de la cromatina activa o inactiva.

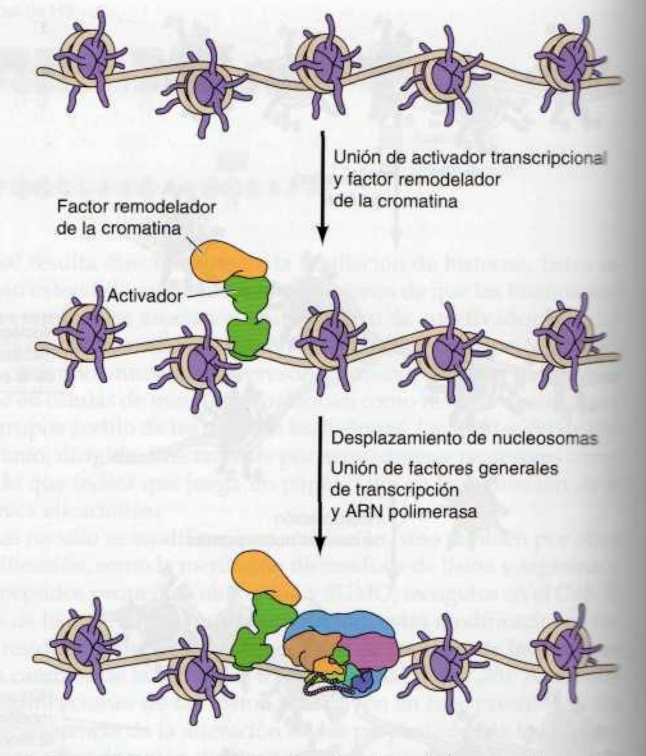


Figura 7.37 Factores remodeladores de la cromatina. Los factores remodeladores de la cromatina alteran la organización o la estructura de los nucleosomas. Por ejemplo, un factor remodelador asociado a un activador transcripcional podría facilitar la unión de un factor general de transcripción y la ARN polimerasa a la cromatina mediante el desplazamiento de los nucleosomas del promotor.

A diferencia de las enzimas que regulan la estructura de la cromatina a través de la modificación de las histonas, los **factores remodeladores de la cromatina** son complejos proteicos que aprovechan energía generada por hidrólisis de moléculas de ATP para alterar los contactos del ADN con las histonas (Fig. 7.37). Un mecanismo de acción de los factores remodeladores de la cromatina es el deslizamiento de los octámeros de las histonas a lo largo de la molécula del ADN que da lugar a la recolocación de los nucleosomas para alterar la accesibilidad de secuencias específicas de ADN para los factores de transcripción. Por otra parte, los factores remodeladores de la cromatina pueden inducir cambios conformacionales en los nucleosomas que también afectarían a la capacidad de secuencias específicas de ADN de interaccionar con proteínas reguladoras transcripcionales. Por último, los factores remodeladores de la cromatina pueden eliminar histonas del ADN para crear una región exenta de nucleosomas. Al igual que las enzimas modificadoras de enzimas, los factores remodeladores pueden incorporarse al ADN en asociación con activadores o represores transcripcionales y alterar la organización de los nucleosomas con el fin de estimular o inhibir la transcripción.

El reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas y factores remodeladores del nucleosoma por los activadores transcripcionales estimula la iniciación de la transcripción alterando la estructura cromatínica de las regiones *enhancer* y promotoras. Sin embargo, tras la iniciación de la transcripción, la ARN polimerasa sigue enfrentándose al problema de la elongación transcripcional a través del molde de cromatina. Esto se ve facilitado por los **factores de elongación** que se asocian al dominio C-terminal fosforilado de la ARN polimerasa II cuando comienza la elongación productiva (véase Fig. 7.32). Entre estos factores figuran enzimas modificadoras de histonas (acetiltransferasas y metiltransferasas) y factores remodeladores de la cromatina que desplazan temporalmente a los nucleosomas en el transcurso de la transcripción.

Regulación de la transcripción por ARN no codificantes

Una serie de adelantos recientes indica que la expresión génica puede regularse no sólo por las proteínas reguladoras de la transcripción de las que nos hemos ocupado hasta ahora, sino también por moléculas de ARN reguladoras no codificantes, como moléculas pequeñas de ARN de interferencia (ARNsi) y microARN (ARNmi). Estas cortas moléculas de ARN bicatenario suelen inhibir la traducción o inducir la degradación de ARNm homólogos por medio de la interferencia de ARN (véase Fig. 4.42) y la regulación génica a este nivel posterior a la traducción se abordará en el Capítulo 8. Por otra parte, los ARN no codificantes pueden inhibir la transcripción a través de la inducción de modificaciones de histonas que provocan condensación cromatínica y la formación de hetercromatina. La represión transcripcional por ARNsi se conoce con detalle en la levadura de fisión *S. pombe*, en la que estas moléculas dirigen la formación de heterocromatina en los centrómeros (Fig. 7.38). Los ARNsi se asocian a un complejo proteico denominado el complejo de silenciamiento transcripcional inducido por ARN (RITS). Las hebras separadas de ARNsi orientan a este complejo hacia el gen homólogo, posiblemente a través del apareamiento de bases con el nuevo transcrito de ARN. El complejo RITS contiene proteínas que inducen condensación cromatínica y metilación de la lisina-9 de la histona H3, lo que induce la formación de heterocromatina. Asimismo, se ha descrito el silenciamiento trans-

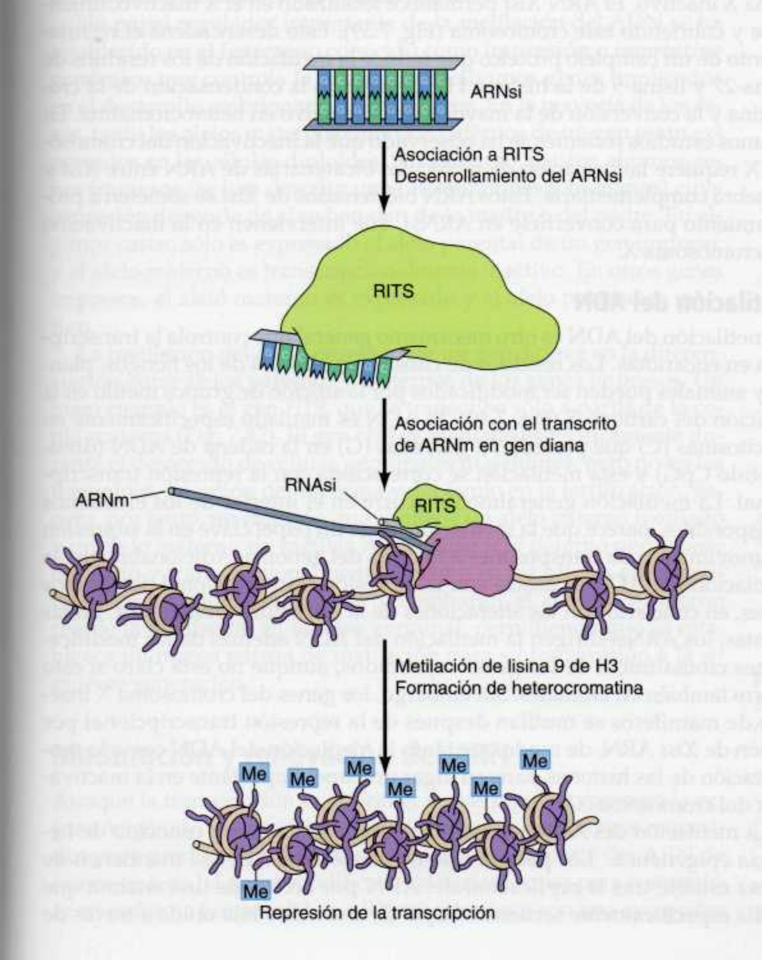


Figura 7.38 Regulación de la transcripción por ARNsi. La asociación transcripcional está mediada por la asociación de ARNsi con el complejo RITS. A continuación, el ARNsi guía al RITS hacia el gen homólogo diana, probablemente por complementariedad con transcritos del ARNm naciente asociado a la ARN polimerasa II. RITS incorpora a una histona metiltransferasa que metila la lisina-9 de la histona H3 y da lugar a la formación de la heterocromatina y la represión de la transcripción.

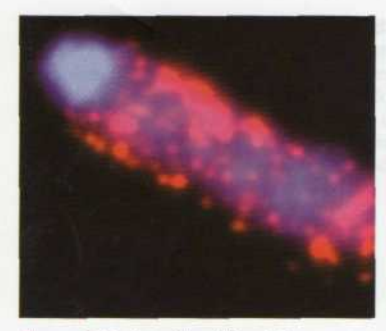


Figura 7.39 Inactivación del cromosoma X. El cromosoma X inactivo (azul) está cubierto por ARN *Xist* (rojo). (De B. Panning y R. Jaenisch, 1998. *Cell* 93:305.)

cripcional por ARNsi en algunas plantas, *C. elegans*, *Drosophila* y células de mamífero, aunque no se conocen bien los mecanismos implicados en estas células.

El fenómeno de la **inactivación del cromosoma X** proporciona un ejemplo del papel de un ARN no codificante en la regulación de la expresión génica en mamíferos. En muchos animales, incluido el hombre, las hembras poseen dos cromosomas X, y los machos poseen un cromosoma X y uno Y. El cromosoma X contiene unos 1.000 genes que no están presentes en el mucho menor cromosoma Y (véase Fig. 5.29). Así, las hembras tienen el doble de copias de la mayoría de los genes del cromosoma X que los machos. A pesar de esta diferencia, las células femeninas y masculinas contienen cantidades equivalentes de las proteínas codificadas por genes del cromosoma X. Esto resulta de un mecanismo de compensación de la dosis, en el que la mayoría de los genes de uno de los dos cromosomas X en las células femeninas se encuentran inactivados tras ser convertidos en heterocromatina en un estadio temprano del desarrollo. En consecuencia, sólo una copia de la mayoría de los genes localizados sobre el cromosoma X está disponible para la transcripción, tanto en células femeninas como masculinas.

Aunque el mecanismo de inactivación del cromosoma X todavía no se comprende por completo, el elemento clave parece ser un ARN no codificante transcrito a partir de un gen regulador, denominado *Xist*, en el cromosoma X inactivo. El ARN *Xist* permanece localizado en el X inactivo, uniéndose y cubriendo este cromosoma (Fig. 7.39). Esto desencadena el reclutamiento de un complejo proteico que induce la metilación de los residuos de lisina-27 y lisina-9 de la histona H3, generando la condensación de la cromatina y la conversión de la mayoría del X inactivo en heterocromatina. En algunos estudios recientes se ha observado que la inactivación del cromosoma X requiere la formación de moléculas bicatenarias de ARN entre *Xist* y su hebra complementaria. Estos ARN bicatenarios de *Xist* se someten a procesamiento para convertirse en ARNsi, que intervienen en la inactivación del cromosoma X.

Metilación del ADN

La metilación del ADN es otro mecanismo general que controla la transcripción en eucariotas. Los residuos de citosina en el ADN de los hongos, plantas y animales pueden ser modificados por la adición de grupos metilo en la posición del carbono-5 (Fig. 7.40). El ADN es metilado específicamente en las citosinas (C) que preceden a guaninas (G) en la cadena de ADN (dinucleótido CpG) y esta metilación se correlaciona con la represión transcripcional. La metilación generalmente ocurre en el interior de los elementos transponibles, parece que la metilación juega un papel clave en la supresión del movimiento de transposones a lo largo del genoma. Adicionalmente, la metilación del ADN se asocia con la represión transcripcional de algunos genes, en concierto con las alteraciones de la estructura cromatínica. En las plantas, los ARNsi dirigen la metilación del ADN además de las modificaciones cromatínicas de los genes reprimidos, aunque no está claro si esto ocurre también en animales. Sin embargo, los genes del cromosoma X inactivo de mamíferos se mutilan después de la represión transcripcional por acción de *Xist* ARN, de modo que tanto la metilación del ADN como la modificación de las histonas parecen jugar un papel importante en la inactivacion del cromosoma X.

La metilación del ADN representa el mecanismo mejor conocido de herencia epigenética. Los patrones de metilación del ADN se mantienen de forma estable tras la replicación del ADN por acción de una enzima que metila específicamente secuencias CpG de una hebra hija unida a través de

Citosina

NH_2

Metilación

5-metilcitosina

NH_2 CH_3

Figura 7.40 Metilación del ADN. Se añade un grupo metilo al carbono en posición 5 de los residuos de citosina del ADN.

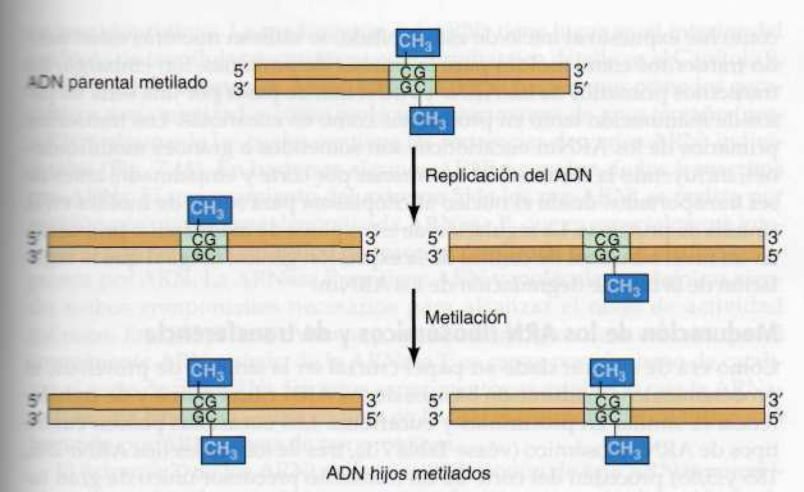


Figura 7.41 Mantenimiento de los modelos o patrones de metilación. En el ADN parental, ambas hebras se encuentran metiladas en las secuencias complementarias CpG. Después de la replicación, sólo la hebra parental de cada molécula hija se encuentra metilada. Las hebras hijas de nueva síntesis se metilan a continuación mediante una enzima que reconoce específicamente las secuencias CpG opuestas al sitio de metilación.

puentes de hidrógeno a la hebra parental metilada (Fig. 7.41). En consecuencia, un gen metilado y reprimido en una célula parental continuará estándolo en las células hijas.

Un papel regulador importante de la metilación del ADN se ha establecido en el fenómeno conocido como **impresión** o ***imprinting* genómico** *que controla la expresión de algunos genes implicados* en el desarrollo embrionario de mamíferos. En la mayoría de los casos, tanto los alelos maternos como los paternos de un gen están expresados en las células diploides. Sin embargo, existen algunos genes impresos (se han descrito unos 70 en ratones y humanos) cuya expresión depende de si se heredan de la madre o del padre. En algunos casos, sólo es expresado el alelo parental de un gen impreso, y el alelo materno es transcripcionalmente inactivo. En otros genes impresos, el alelo materno es expresado y el alelo paterno es inactivo.

La metilación del ADN parece jugar un papel clave en la diferenciación entre alelos paternos y maternos de los genes impresos. Un buen ejemplo es el gen *H19*, que se transcribe sólo a partir de la copia materna (Fig. 7.42). El gen *H19* es metilado específicamente durante el desarrollo de células germinales masculinas, pero no en las femeninas. La unión del esperma y del óvulo en la fertilización, genera, por tanto, un embrión que contiene un alelo paterno metilado y un alelo materno sin metilar. Así, el alelo *H19* paterno permanece metilado y transcripcionalmente inactivo en las células embrionarias y en los tejidos somáticos. Sin embargo, el alelo *H19* paterno pierde la metilación en la línea germinal, permitiendo que se establezca un nuevo patrón de metilación para su transmisión a la siguiente generación.

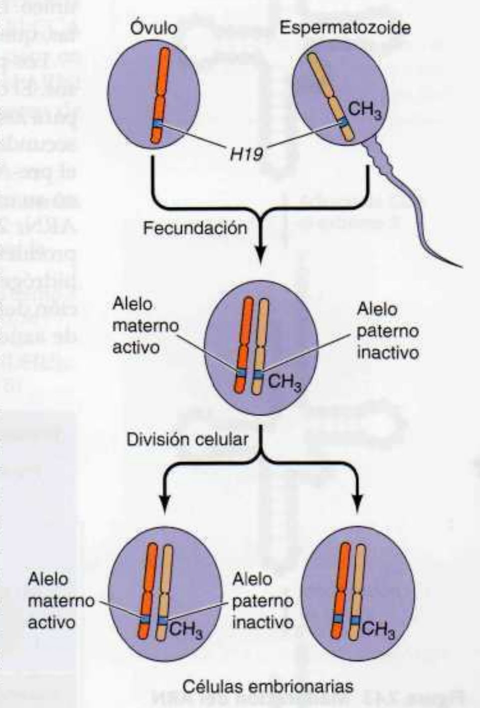


Figura 7.42 Impresión genómica. El gen *H19* es metilado de forma específica durante el desarrollo de las células germinales masculinas. Por este motivo los espermatozoides contienen un alelo *H19* metilado y los óvulos uno no metilado. Con la fecundación y ulteriores divisiones celulares, el alelo paterno continuará estando metilado e inactivo respecto a la transcripción, de modo que solamente se expresará el alelo materno no metilado en el embrión.

Maduración y renovación del ARN

Aunque la transcripción es el primer y más regulado paso en la expresión génica, es sólo el principio de una serie de procesos requeridos para producir un ARN funcional. La mayor parte del ARN de nueva síntesis ha de ser modificado de varias formas para convertirse en su forma funcional. Los ARNm bacterianos son una excepción;

como fue expuesto al inicio de este capítulo, se utilizan mientras están siendo transcritos como moldes para la síntesis de proteínas. Sin embargo, los transcritos primarios de los ARNr y ARNt han de pasar por una serie de pasos de maduración tanto en procariotas como en eucariotas. Los transcritos primarios de los ARNm eucarióticos son sometidos a grandes modificaciones, incluyendo la eliminación de intrones por corte y empalmado, antes de ser transportados desde el núcleo al citoplasma para servir de moldes en la síntesis de proteínas. La regulación de estos pasos de maduración proporciona un nivel adicional de control de la expresión génica, al igual que la regulación de la tasa de degradación de los ARNm.

Maduración de los ARN ribosómicos y de transferencia

Como era de esperar dado su papel crucial en la síntesis de proteínas, el procesamiento o maduración básicos de los ARN ribosómicos y de transferencia es similar en procariotas y eucariotas. Los eucariotas poseen cuatro tipos de ARN ribosómico (véase Tabla 7.1), tres de los cuales (los ARNr 28S, 18S y 5,8S) proceden del corte de un transcrito precursor único de gran tamaño, denominado **pre-ARNr** (Fig. 7.43). Los procariotas poseen tres ARN ribosómicos (23S, 16S y 5S), que son equivalentes a los ARNr 28S, 18S y 5,8S de las células eucarióticas y son también obtenidos a partir de un pre-ARNr único. El único ARNr que no es apenas procesado es el ARNr 5S en eucariotas, que se transcribe a partir de un gen distinto.

Los pre-ARNr procarióticos y eucarióticos son madurados en varios pasos. El corte inicial del pre-ARNr bacteriano produce precursores separados para los tres ARNr; estos continúan su maduración por medio de escisiones secundarias hasta obtener sus productos finales. En las células eucarióticas el pre-ARNr sufre inicialmente un corte en un sitio adyacente al ARNr 5,8S en su extremo 5', dando dos precursores que contienen el ARNr 18S y los ARNr 28S y 5,8S, respectivamente. Escisiones posteriores dan lugar a los productos finales, tras lo que el ARNr 5.8S se une por medio de puentes de hidrógeno a la molécula 28S. Además de los procesos de corte, en la maduración del ARNr tiene lugar la adición de grupos metilo a las bases y residuos de azúcares de nucleótidos específicos y la conversión de algunas uridinas

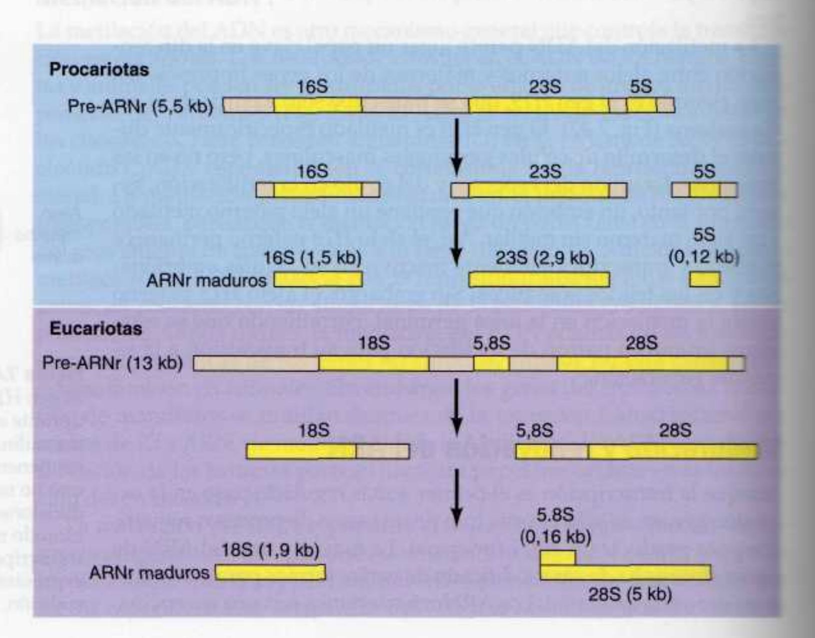


Figura 7.43 Maduración del ARN ribosómico. Las células procarióticas contienen tres ARNr (16S, 23S y 5S) formados por el corte de un transcrito pre-ARNr. Las células eucarióticas (p. ej., las células humanas) contienen cuatro ARNr. Uno de ellos (el ARNr 5S) se transcribe de un gen diferente; los otros tres (18S, 28S y 5,8S) derivan de un pre-ARNr común. Después del corte, el ARNr 5,8S (que es exclusivo de eucariotas) se une al ARNr 28S mediante puentes de hidrógeno.

en pseudouridinas. La maduración del ARNr tiene lugar en el interior del nucléolo de las células eucarióticas, y se estudiará en detalle en el Capítulo 9.

De igual forma que los ARNr, tanto los ARNt bacterianos como los eucarióticos son sintetizados como moléculas precursoras de gran tamaño (**pre-ARNt**), alguna de las cuales contiene las secuencias de varios ARNt individuales (Fig. 7.44). En bacterias algunos ARNt proceden de los transcritos pre-ARNr. El procesamiento del extremo 5'de los pre-ARNt se realiza por escisión por una enzima denominada **ARNasa P**, que es especialmente interesante porque es un prototipo de reacción catalizada por una enzima compuesta por ARN. La ARNasa P contiene ARN y moléculas proteínicas siendo ambos componentes necesarios para alcanzar el nivel de actividad máximo. En 1983 Sidney Altman y sus colaboradores demostraron que el componente ARN aislado de la ARNasa P es capaz por sí mismo de catalizar el corte de pre-ARNt. En estos experimentos se estableció que la ARNasa P es una **ribozima** —una enzima en la cual el componente catalítico está formado por ARN en vez de por proteínas.

El extremo 3' de los ARNt se forma por la acción de una ARNasa proteínica convencional, pero el procesamiento de este extremo de la molécula de ARN incluye también una actividad inusual: la adición de una secuencia terminal CCA. Todos los ARNt poseen la secuencia CCA en su extremo 3'. Esta secuencia es el sitio de unión de aminoácidos, por lo que es necesaria para el funcionamiento del ARNt durante la síntesis de proteínas. El CCA terminal está codificado en el ADN de algunos genes de ARNt, pero en otros no lo está y es añadido como un paso más en la maduración del ARNt por una enzima que reconoce y añade el CCA a los ARNt que carecen de esta secuencia.



Figura 7.44 Maduración del ARN de transferencia. (A) Los ARN de transferencia derivan de pre-ARNt, algunos de los cuales contienen varias moléculas independientes de ARNt. El corte en el extremo 5' del ARNt es catalizado por la ribozima ARNasa P; el corte en el extremo 3' es catalizado por una proteína RNAasa convencional. Posteriormente se añade una terminación CCA al extremo 3' de muchos ARNt en una fase de maduración postranscripcional. Por último, se modifican algunas bases en determinadas posiciones dentro de la molécula de ARNt. En este ejemplo, los nucleósidos modificados son la dihidrouridina (DHU), la metilguanosina (mG), inosina (I), ribotimidina (T) y pseudouridina (ψ). (B) Estructura de las bases modificadas. La ribotimidina, dihidrouridina y pseudouridina se forman por modificación de las uridinas del ARNt. La inosina y la metilguanosina se forman por la modificación de guanosinas.

(B) Bases modificadas

Ribosa
Dihidrouridina (DHU)

Ribosa
Ribotimidina (T)

Ribosa
Pseudouridina (ψ)

Ribosa
Inosina (I)

Ribosa
^{2}N-Metilguanosina (mG)

Otro aspecto inusual de la maduración del ARNt es la amplia modificación que sufren las bases que forman las moléculas de ARNt. Aproximadamente el 10% de las bases de ARNt es alterada para dar una serie de nucleótidos modificados en posiciones específicas de las moléculas de ARNt (véase Fig. 7.44). La función de la mayoría de estas bases modificadas se desconoce, pero algunas desempeñan un importante papel en la síntesis proteínica alterando las propiedades de apareamiento de bases de la molécula de ARNt (véase Cap. 8).

Algunos pre-ARNt, de igual forma que los pre-ARNr de determinados organismos, contienen intrones que son eliminados por corte y empalme (o *splicing*). A diferencia de otras reacciones de corte y empalme, que (como se comenta en la sección relativa al procesamiento del ARNm), el *splicing* de los ARNt está mediado por enzimas proteicas convencionales. Una endonucleasa escinde el pre-ARNt en los puntos de corte para escindir el intrón, seguido de la unión de los exones para formar una molécula de ARNt madura.

Maduración del ARNm en eucariotas

A diferencia de lo que ocurre con la maduración de los ARN ribosómico y de transferencia, la maduración del ARN mensajero presenta importantes diferencias entre células procarióticas y eucarióticas. En las bacterias los ribosomas tienen un acceso inmediato al ARNm y la traducción comienza en el ARNm naciente mientras está todavía en marcha la transcripción. En eucariotas el ARNm sintetizado en el núcleo ha de ser transportado al citoplasma antes de ser usado como molde en la síntesis de proteínas. Además,

> **7.2 Animación web**
> **Procesamiento del ARN**
> Las células eucariotas deben procesar el producto de ARN procedente de la transcripción para formar un ARNm maduro y traducible.

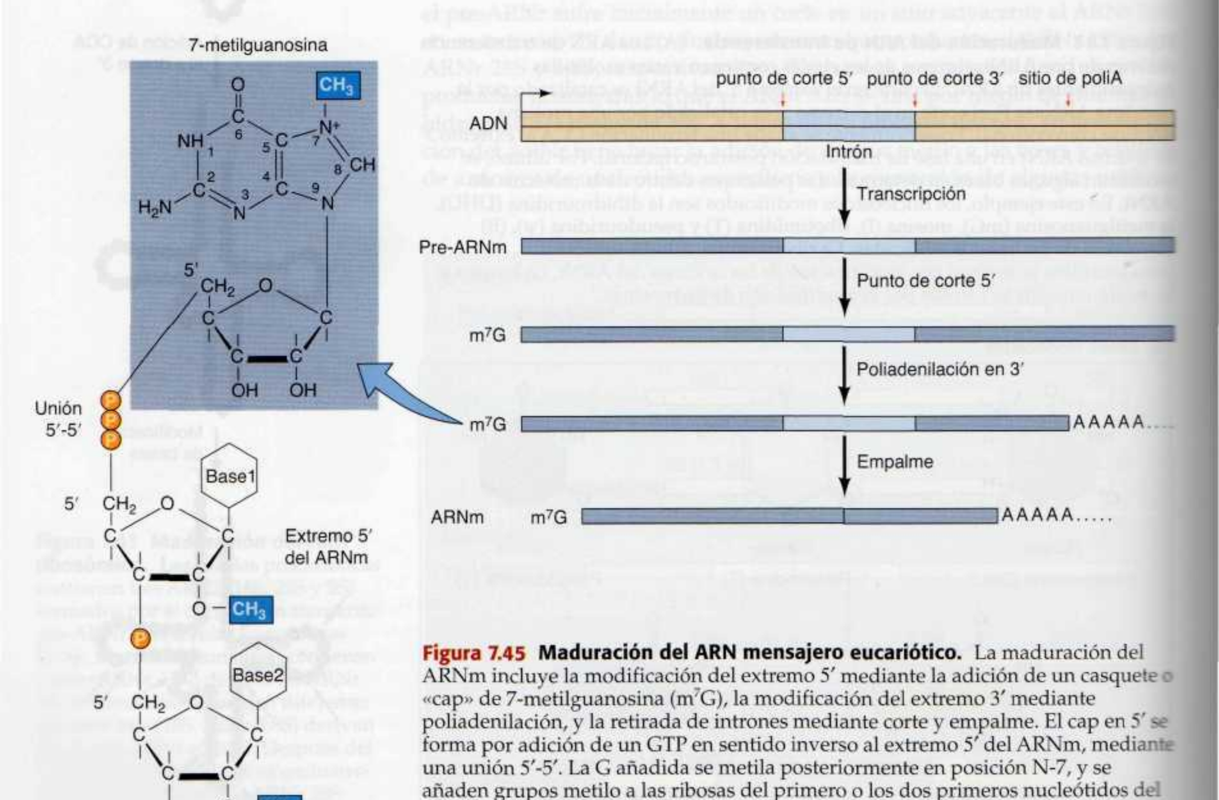


Figura 7.45 Maduración del ARN mensajero eucariótico. La maduración del ARNm incluye la modificación del extremo 5′ mediante la adición de un casquete o «cap» de 7-metilguanosina (m^7G), la modificación del extremo 3′ mediante poliadenilación, y la retirada de intrones mediante corte y empalme. El cap en 5′ se forma por adición de un GTP en sentido inverso al extremo 5′ del ARNm, mediante una unión 5′-5′. La G añadida se metila posteriormente en posición N-7, y se añaden grupos metilo a las ribosas del primero o los dos primeros nucleótidos del ARNm.

los productos iniciales de la transcripción eucariótica (**pre-ARNm**) son ampliamente modificados antes de salir del núcleo. El procesamiento o maduración del pre-ARNm incluye la modificación de ambos extremos de la molécula, así como la eliminación de los intrones de su interior (Fig. 7.45). En lugar de tener lugar como sucesos independientes después de la síntesis del pre-ARNm, estas reacciones de maduración están acopladas a la transcripción, de modo que la síntesis del ARNm y la maduración constituyen pasos estrechamente coordinados en la expresión génica. El dominio C-terminal (CTD) de la ARN polimerasa II juega un papel clave en la coordinación de estos procesos, sirviendo como sitio de unión para los complejos enzimáticos implicados en la maduración del ARNm. La asociación de estas enzimas de maduración con el CTD de la polimerasa II es responsable de su especificidad en el procesamiento de ARNm; las polimerasas I y II carecen de CTD, de modo que sus productos no son procesados por los mismos complejos enzimáticos.

El primer paso en la maduración del ARNm es la modificación del extremo 5′ del transcrito mediante la adición de una estructura denominada **caperuza o cap de 7-metilguanosina**. Las enzimas responsables de la formación de esta caperuza son reclutadas al CTD fosforilado siguiendo la iniciación de la transcripción, y la caperuza es añadida tras la transcripción de los primeros 20-30 nucleótidos de ARN. La formación de la caperuza es iniciada por la adición de una molécula de GTP en orientación inversa al nucleótido 5′ terminal del ARN. A continuación se añaden grupos metilo a este residuo de G y a las formas de ribosa de uno o dos nucleótidos 5′ de la cadena de ARN. La caperuza en 5′ estabiliza el ARN, además de alinear los ARNm eucarióticos sobre el ribosoma durante la traducción (Cap. 8).

El extremo 3′ de la mayoría de los ARNm eucarióticos se forma no por la terminación de la transcripción, sino por el corte del transcrito primario y la adición de una **cola de poli-A** —una reacción de la maduración denominada **poliadenilación** (Fig. 7.46)—. Las señales para la poliadenilación incluyen un hexanucleótido altamente conservado (AAUAAA en células de mamífero), que está localizado entre 10 y 30 nucleótidos corriente arriba del sitio de poliadenilación, y un elemento de secuencias ricas en G-U corriente abajo. Adicionalmente, algunos genes poseen elementos de secuencias ricas en G-U corriente arriba del motivo AAUAAA. Estas secuencias son reconocidas por un grupo de proteínas, que incluyen una endonucleasa que corta la cadena de ARN y una poli-A polimerasa que añade una cola de unos 200 nucleótidos al transcrito de ARN. Estas enzimas procesadoras están asociadas con el CTD fosforilado de la ARN polimerasa II, y pueden viajar con la polimerasa desde el punto de iniciación. La escisión y poliadenilación se siguen de la degradación del ARN que ha sido sintetizado más adelante

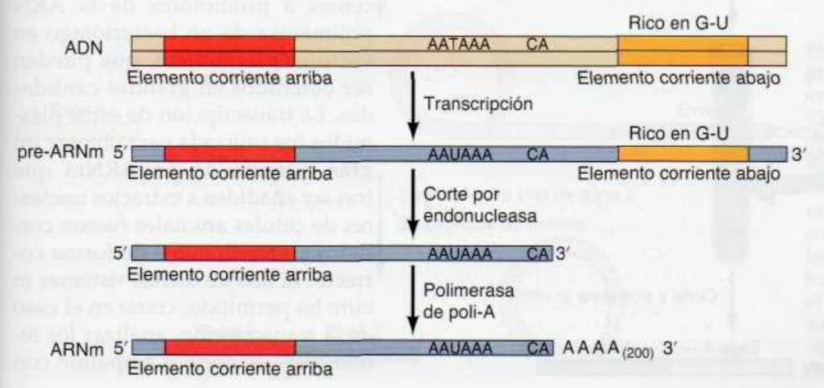


Figura 7.46 Formación del extremo 3′ del ARNm eucariótico. Las señales de poliadenilación en células de mamíferos consisten en un hexanucleótido AAUAAA añadido a elementos corriente arriba y abajo (ricos en G-U). Una endonucleasa corta el pre-ARNm a unos 10 a 30 nucleótidos corriente abajo del AAUAAA, habitualmente en una secuencia CA. Posteriormente la polimerasa poli-A añade al extremo 3′ del ARN la cola de poli-A, que está formada por unos 200 nucleótidos de adenina (A).

del punto de adición de poli-A, resultando en la terminación de la transcripción.

La mayoría de los ARNm eucarióticos está poliadenilada, y se sabe que las colas de poli-A regulan la traducción y la estabilidad del ARNm. La poliadenilación tiene también un importante papel regulador en fases iniciales del desarrollo, donde cambios en la longitud de las colas de poli-A controlan la traducción del ARNm. Por ejemplo, muchos ARNm están almacenados en óvulos no fertilizados en una forma no traducida con colas cortas de poli-A (habitualmente de 30 a 50 nucleótidos de longitud). La fertilización estimula el alargamiento de las colas de poli-A de los ARNm almacenados, lo cual a su vez activa su traducción y la síntesis de las proteínas necesarias para el desarrollo embrionario.

La modificación más llamativa de los pre-ARNm es la eliminación de intrones por el procedimiento de corte y empalme o *splicing*. Como fue expuesto en el Capítulo 5, las secuencias codificantes de la mayoría de los genes eucarióticos están interrumpidas por secuencias no codificantes (intrones) que son escindidas de forma precisa del ARNm maduro. En mamíferos, la mayor parte de los genes contienen múltiples intrones, que habitualmente cuentan con unas diez veces más de secuencias de pre-ARNm, que los exones. El descubrimiento inesperado de los intrones en 1977 generó un activo esfuerzo investigador dirigido a la compresión de los mecanismos de corte y empalme, que se suponía deberían ser altamente específicos para producir ARNm funcionales. Estudios posteriores de los fenómenos de corte y empalme no sólo han ilustrado nuevos mecanismos de regulación génica, sino que también han revelado la actividad catalítica de ciertas moléculas de ARN.

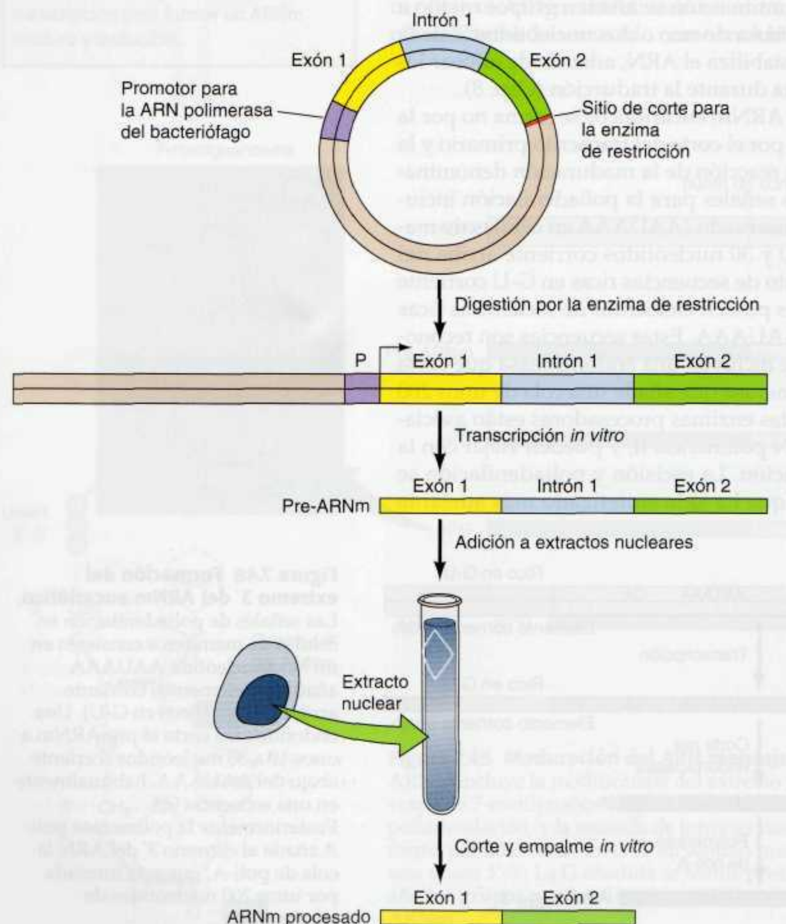


Figura 7.47 Corte y empalme *in vitro*. Se procede a la clonación de un gen que contiene un intrón y está situado corriente abajo de un promotor (P), el cual es reconocido por la ARN polimerasa de un bacteriófago. El plásmido es digerido con una enzima de restricción que realiza un corte en el extremo 3′ del gen insertado para conseguir una molécula de ADN lineal. Este ADN se transcribe *in vitro* con la polimerasa del bacteriófago, obteniéndose un pre-ARNm. Las reacciones de corte y empalme pueden ser estudiadas añadiendo *in vitro* este pre-ARNm a extractos nucleares de células de mamíferos.

Mecanismos de corte y empalme o *splicing*

La clave para entender los mecanismos de corte y empalme fue el desarrollo de sistemas *in vitro* que llevaran a cabo de forma eficiente la reacción (Fig. 7.47). Los pre-ARNm fueron sintetizados *in vitro* por medio de la clonación de genes estructurales (con sus intrones) adyacentes a promotores de la ARN polimerasa de un bacteriófago en vectores plasmídicos, que pueden ser obtenidos en grandes cantidades. La transcripción de estos plásmidos fue utilizada para obtener un gran número de pre-ARNm que tras ser añadidos a extractos nucleares de células animales fueron cortados y empalmados de forma correcta. El uso de dichos sistemas *in vitro* ha permitido, como en el caso de la transcripción, analizar los fenómenos de corte y empalme con

mucho mayor detalle de lo que hubiera sido posible utilizando células intactas.

El análisis de los productos de la reacción y de los intermediarios formados *in vitro* reveló que el corte y empalmado del pre-ARNm tiene lugar en dos etapas (Fig. 7.48). En primer lugar el pre-ARNm es cortado en el sitio de corte y empalme 5′, y el extremo 5′ del intrón se une a un nucleótido de adenina del intrón (cerca de su extremo 3′). En este paso se forma un vínculo inusual entre el extremo 5′ del intrón y el grupo hidroxilo 2′ de la adenina. El intermediario resultante es una estructura en lazo, en la que el intrón forma un bucle. El segundo paso tiene lugar con el corte en 3′ y la unión simultánea de los dos exones. El intrón es escindido como una estructura en forma de lazo que es posteriormente degradada en el núcleo de las células intactas.

Estas reacciones definen tres secuencias críticas en los ARNm: la secuencia en el sitio de corte 5′, la secuencia en el sitio de corte 3′ y las secuencias en el punto o sitio de ramificación (el punto en el que se une el extremo 5′ del intrón para formar la estructura en forma de lazo) (véase Fig. 7.48). Los pre-ARNm contienen secuencias consenso similares en cada una de estas tres posiciones, permitiendo al complejo de corte y empalme reconocer a los pre-ARNm y llevar a cabo las reacciones de corte y unión implicadas en el proceso.

El análisis bioquímico de extractos nucleares ha revelado que el *splicing* tiene lugar en grandes complejos, denominados **espliceosomas**, compuestos de proteínas y ARN. Los ARN que forman parte de los espliceosomas son cinco tipos de **ARN nuclear de pequeño tamaño (ARNsn)** denominados U1, U2, U4, U5 y U6. Estos ARN, que tienen un tamaño de entre 50 y 200 nucleótidos, forman un complejo con entre seis y diez moléculas proteínicas para dar **partículas pequeñas de rinonucleoproteínas nucleares (RNPsn)**, que tienen un papel central en el proceso de *splicing*. Las RNPsn U1, U2 y U5 contienen cada una una molécula única de ARNsn, mientras que las RNPsn U4 y U6 están unidas entre sí formando una única RNPsn.

El primer paso en la formación del espliceosoma es la unión de la RNPsn U1 al sitio de corte 5′ del pre-ARNm (Fig. 7.49). Este reconocimiento de los sitios de corte 5′ se realiza por medio del apareamiento de bases entre la secuencia del consenso del sitio de corte 5′ y una secuencia complementaria en el extremo 5′ del ARNsn U1 (Fig. 7.50). Posteriormente la RNPsn U2 se

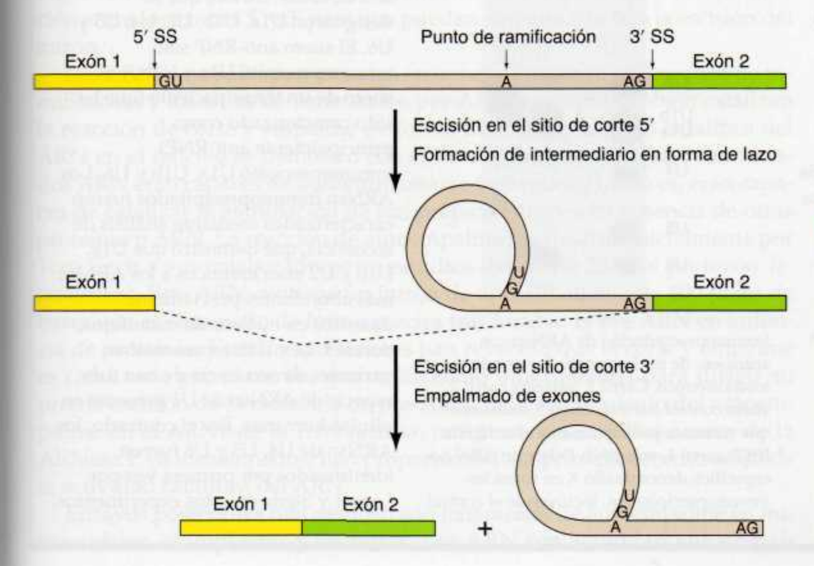


Figura 7.48 Corte y empalme del pre-ARNm. El proceso de corte y empalme se lleva a cabo en dos pasos. El primer paso consiste en una escisión en el sitio de corte 5′ (SS) y la unión del extremo 5′ del intrón con una A contenida en el intrón (punto de ramificación). Con esta reacción se consigue un intermediario en forma de lazo, dentro del cual el intrón forma un bucle. El segundo paso es la escisión en el sitio de corte 3′ y el empalmado simultáneo de los exones, obteniéndose por escisión del intrón como una estructura en forma de lazo.



EXPERIMENTO CLAVE

Descubrimiento del RNPsn

Los anticuerpos frente a ARN pequeños nucleares que forman complejos con proteínas son producidos por pacientes con lupus eritematoso

Michael R. Lerner y Joan A. Steitz

Yale University, New Haven, Connecticut

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1979,

Volumen 76, págs. 5495-5499



Joan Steitz

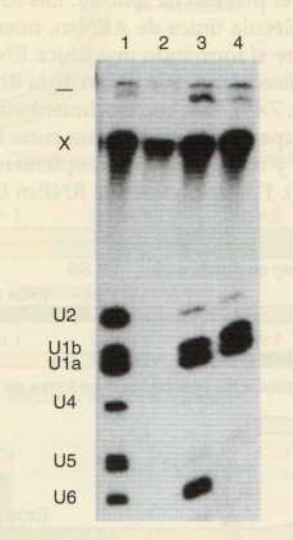
Contexto

El descubrimiento de los intrones en 1977 implicaba que una reacción de maduración totalmente novedosa era requerida para producir ARNm en las células eucarióticas. Los intrones debían ser escindidos con precisión del pre-ARNm, seguido de la unión de los exones para dar lugar a una molécula de ARNm madura. Dada la naturaleza inesperada del *splicing* del ARNm, comprender el mecanismo de la reacción de corte y empalme cautivó la atención de muchos biólogos moleculares. Uno de los principales pasos en la elucidación de este mecanismo fue el descubrimiento de los RNPsn y su implicación en el *splicing* del pre-ARNm.

Los ARN pequeños nucleares fueron identificados por primera vez en las células eucarióticas a finales de los años 60. Sin embargo, la función de los ARNsn permanecía desconocida. En este trabajo de 1979, Michael Lerner y Joan Steitz demostraron que los ARNsn más abundantes estaban presentes formando complejos ARN-proteína denominados RNPsn. Además, proporcionaron la primera sugerencia de que estos complejos ARN-proteína podrían funcionar en el *splicing* del pre-ARNm. Esta identificación de RNPsn llevó a una variedad de experimentos que confirmaron sus papeles y elucidaron el mecanismo por el que tiene lugar el *splicing* del pre-ARNm.

Experimentos

La identificación de los RNPsn se basó en el uso de antisuero de pacientes con lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmune en la que los pacientes producen anticuerpos frente a constituyentes celulares normales. Muchos de los anticuerpos producidos por pacientes de lupus eritematoso sistémico están dirigidos frente a componentes del núcleo, incluyendo ADN, ARN e histonas. El descubrimiento de las RNPsn surgió de estudios en los que Lerner y Steitz trataron de caracterizar dos antígenos, denominados ribonucleoproteína (RNP) y Sm, que eran reconocidos por anticuerpos de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Datos indirectos sugirieron que RNP consistía tanto de proteína como de ARN, como su nombre indica, pero ni RNP ni Sm habían sido caracterizados a nivel molecular.



Inmunoprecipitación de ARNsn con antisuero de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Carril 1, anti-Sm; carril 2, suero control normal; carril 3, antisuero que reconoce principalmente el antígeno RNP; carril 4, anti-RNP. Existe un ARN no específico denominado X en todos los inmunoprecipitados, incluyendo el control.

Para identificar los posibles componentes de ARN en los antígenos RNP y Sm, ARN nucleares de células de ratón fueron marcadas con ^{32}P e inmunoprecipitadas con antisuero de diferentes pacientes de lupus eritematoso sistémico (véase Fig. 4.30). Se encontraron seis especies específicas de ARNsn que eran inmunoprecipitadas selectivamente con antisuero de diferentes pacientes, pero no por suero de un paciente control normal (véase figura). El suero anti-Sm inmunoprecipitó a los seis de estos ARNsn, que se designaron U1a, U1b, U2, U4, U5 y U6. El suero anti-RNP sólo inmunoprecipitó U1a y U1b, y el suero de un tercer paciente (que ha sido caracterizado como principalmente anti-RNP) inmunoprecipitó U1a, U1b y U6. Los ARNsn inmunoprecipitados fueron caracterizados mediante análisis de secuencia, que demostró que U1a, U1b y U2 eran idénticos a los ARNsn más abundantes previamente descritos en núcleos de mamíferos, donde U1a y U1b representaban variantes de secuencia de una sola especie de ARNsn de U1 presente en células humanas. Por el contrario, los ARNsn de U4, U5 y U6 fueron identificados por primera vez por Lerner y Steitz en estos experimentos.

EXPERIMENTO CLAVE

La inmunoprecipitación de estos ARNsn demostró que eran componentes de complejos ARN-proteína. Se había demostrado previamente que el suero anti-Sm, que inmunoprecipitó los seis ARNsn estaba dirigido frente a un antígeno proteico. De forma similar, se sabía que la proteína era necesaria para el reconocimiento antigénico por parte del suero anti-RNP. Es más, Lerner y Steitz demostraron que ninguno de los ARNsn podían ser inmunoprecipitados si la proteína se eliminaba primero mediante una extracción del ARN con fenol. Más análisis de las células en las que se habían marcado las proteínas con ^{35}S-metionina identificó a siete proteínas nucleares prominentes que fueron inmunoprecipitadas junto con los ARNsn con los sueros anti-Sm y anti-RNP. Así, estos datos indicaban que cada uno de los seis ARNsn estaba presente en un complejo RNPsn con proteínas nucleares específicas.

Impacto

El descubrimiento de que los ARNsn eran componentes de las RNPsn que eran reconocidos por antisueros específicos abrió un nuevo enfoque para el estudio de la función del ARNsn. Lerner y Steitz indicaron que un posible papel «muy intrigante» para los ARNsn podría ser en el *splicing* de pre-ARNm, y señalizaron que las secuencias próximas al extremo 5′ del ARNsn U1 eran complementarias a los puntos de corte y empalme.

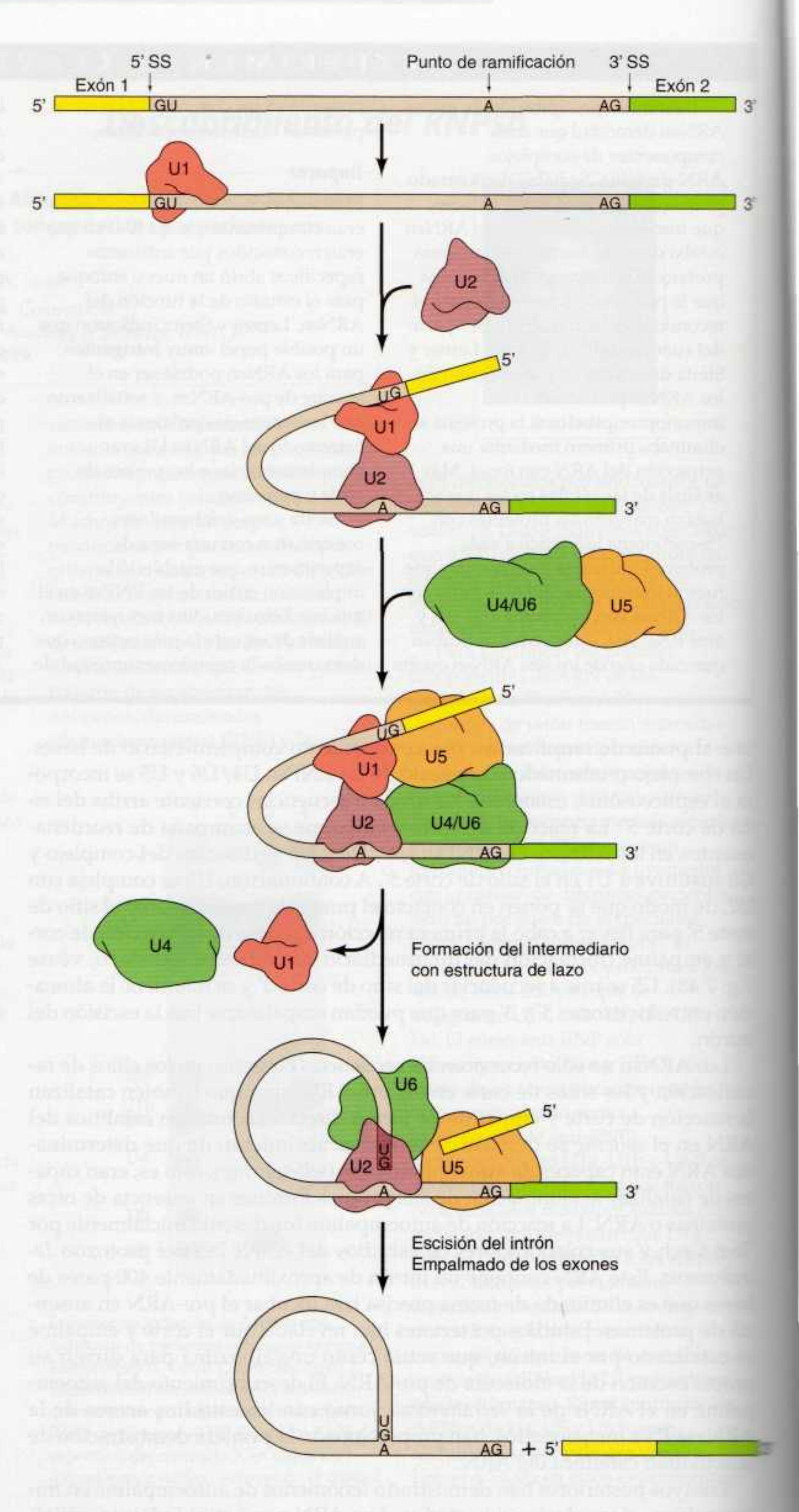
Steitz y sus colaboradores continuaron con una serie de experimentos que estableció la implicación crítica de las RNPsn en el *splicing*. Estos estudios incluyeron un análisis de secuencia más extenso que demostraba la complementariedad de las secuencias conservadas en 5′ del ARNsn U1 a las secuencias consenso de sitios de corte y empalme en 5′, sugiriendo que U1 funcionaba en el reconocimiento del sitio de corte y empalme en 5′. Adicionalmente, el antisuero frente a RNPsn se empleó para demostrar que U1 era necesaria para el *splicing* de pre-ARNm tanto en núcleos aislados como en extractos de corte y empalme *in vitro*. Más estudios han seguido para demostrar que los ARNsn por sí mismos juegan papeles críticos no sólo en la identificación de los sitios de corte y empalme, sino también como catalizadores de la reacción de *splicing*. El descubrimiento inicial de que los ARNsn eran componentes de las RNPsn que podían ser reconocidos por antisueros específicos abrió la puerta a la comprensión del mecanismo de procesamiento del pre-ARNm.

une al punto de ramificación por apareamiento complementario de bases. Un complejo preformado compuesto de las RNPsn U4/U6 y U5 se incorpora al espliceosoma, estando la U5 unida a secuencias corriente arriba del sitio de corte 5′. La reacción de corte y empalme se acompaña de reordenamientos en los ARNsn. Las RNPsn U4 /U6 y U5 se disocian del complejo y U6 sustituye a U1 en el sitio de corte 5′. A continuación, U6 se compleja con U2, de modo que se ponen en contacto el punto de ramificación y el sitio de corte 5′ para llevar a cabo la primera reacción del paso de la reacción de corte y empalme (formación del intermediario con estructura de lazo, véase Fig. 7.48). U5 se une a secuencias del sitio de corte 3′ y se mantiene la alineación entre los exones 5′ y 3′ para que puedan empalmarse tras la escisión del intrón.

Los ARNsn no sólo reconocen las secuencias consenso en los sitios de ramificación y los sitios de corte en los pre-ARN, sino que también catalizan la reacción de corte y empalme de forma directa. La función catalítica del ARN en el *splicing* se demostró con el descubrimiento de que determinados ARN eran capaces de **autoempalmarse** (*self-splicing*), esto es, eran capaces de catalizar la eliminación de sus propios intrones en ausencia de otras proteínas o ARN. La reacción de autoempalme fue descrita inicialmente por Tom Cech y sus colaboradores en estudios del ARNt 28S del protozoo *Tetrahymena*. Este ARN contiene un intrón de aproximadamente 400 pares de bases que es eliminado de forma precisa tras incubar el pre-ARN en ausencia de proteínas. Estudios posteriores han revelado que el corte y empalme es catalizado por el intrón, que actúa como una ribozima para dirigir su propia escisión de la molécula de pre-ARN. El descubrimiento del autoempalme en el ARNr de la *Tetrahymena*, junto con los estudios acerca de la ARNasa P ya mencionados, han proporcionado la primera demostración de la actividad catalítica del ARN.

Ensayos posteriores han demostrado fenómenos de autoempalme en mitocondrias, cloroplastos y bacterias. Los ARN con actividad autoempal-

Figura 7.49 Ensamblaje del espliceosoma. El primer paso en el ensamblaje del espliceosoma es la unión del RNPsn U1 al sitio de corte 5′ (SS), seguido de la unión del RNPsn U2 al punto de ramificación. A continuación se incorpora al espliceosoma un complejo preformado que contiene las RNPsn U4/U6 y U5. La U5 se une a secuencias corriente arriba del punto de corte 5′, y la U6 se separa de la U4 y desplaza a la U1. U4 y U1 se disocian del esplicesoma y U6 forma un complejo con U2 que da lugar a la formación del intermediario con estructura de lazo. U5 se une al sitio de corte 3′ y se mantiene la asociación entre los exones 5′ y 3′ para que puedan empalmarse tras la escisión del intrón.



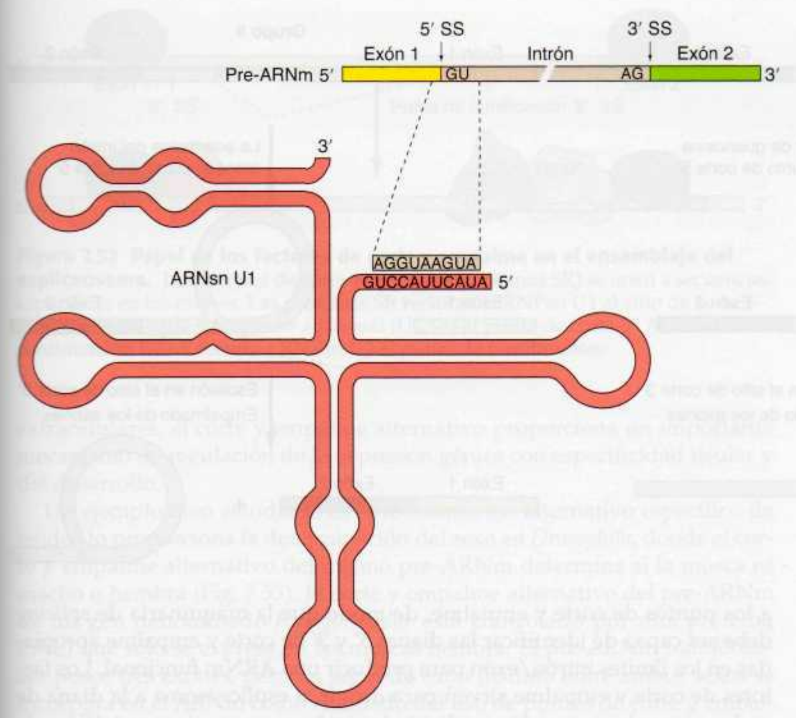


Figura 7.50 Unión del ARNsn U1 al sitio de corte 5′. El extremo 5′ del ARNsn U1 se une a las secuencias consenso de los sitios de corte 5′ mediante el apareamiento complementario de bases.

mante se dividen en clases según su mecanismo de acción (Fig. 7.51). El primer paso en el corte y empalme de los intrones de tipo I (p. ej., el pre-ARN de la *Tetrahymena*) es la escisión en el sitio de corte 5′ mediado por un cofactor de guanosina. El extremo 3′ del exón liberado reacciona con el sitio de corte 3′ para escindir el intrón como un ARN lineal. Sin embargo, las reacciones de autoempalme de los intrones de tipo II (p. ej., algunos pre-ARN mitocondriales) son muy similares al corte y empalme nuclear del pre-ARNm, en el que la escisión del sitio de corte 5′ se sigue de la formación de una estructura con forma de lazo en el intrón, que luego es escindido.

La similitud entre el corte y empalme del pre-ARNm mediado por espliceosomas y el autoempalme de los intrones de tipo II sugirió que los componentes catalíticamente activos del espliceosoma son ARN en vez de proteínas. Esta similitud sugirió en particular que el corte y empalme del pre-ARNm estaba catalizado por los ARNsn del espliceosoma. Estudios posteriores del corte y empalme del pre-ARNm han proporcionado un claro soporte para esta visión, y se sabe que U2 y U6, en ausencia de proteínas, pueden catalizar ambos pasos en el corte y empalme del pre-ARNm. El corte y empalme del pre-ARNm es por tanto, considerado como una reacción basada en ARN, catalizada por los ARNsn del espliceosoma que actúan de forma análoga a los intrones de autoprocesamiento del grupo II. Sin embargo, en el interior de la célula los componentes proteicos de los RNPsn también son necesarios, y participan tanto en el ensamblaje del espliceosoma como en la reacción de corte y empalme.

Un cierto número de factores proteicos de *splicing* que no son componentes de las RNPsn, también juegan papeles críticos en el ensamblaje del espliceosoma, especialmente en la identificación de los sitios correctos de corte y empalme en los pre-ARNm. Los pre-ARNm de mamíferos generalmente contienen múltiples exones cortos (una media de 150 nucleótidos en humanos) separados por intrones mucho más largos (una media de 3.500 nucleótidos). Los intrones frecuentemente contienen muchas secuencias parecidas

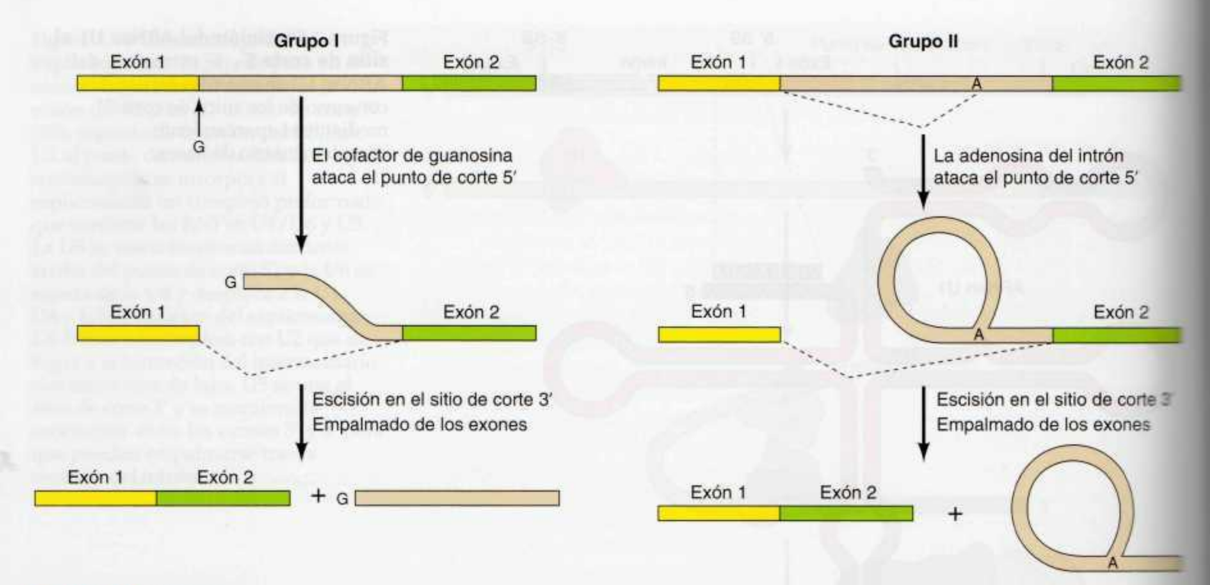


Figura 7.51 Intrones autoempalmantes (*self-splicing*). Los intrones autoempalmantes de los grupos I y II se distinguen por sus mecanismos de actuación. En los intrones del grupo I, el primer paso es la escisión en el punto de corte 5′ gracias a la reacción con un cofactor de guanosina. El resultado es un intermediario lineal que tiene una G añadida al extremo 5′ del intrón. En los intrones del grupo II (como en el corte y empalme del pre-ARNm) el primer paso es la escisión en el punto de corte 5′ por reacción con una A del interior del intrón, dando lugar a un intermediario con estructura de lazo. En ambos casos el segundo paso es la escisión del sitio de corte 3′ y el simultáneo empalmado de los exones.

a los puntos de corte y empalme, de modo que la maquinaria de *splicing* debe ser capaz de identificar las dianas 5′ y 3′ de corte y empalme apropiadas en los límites intrón/exón para producir una ARNm funcional. Los factores de corte y empalme sirven para dirigir al espliceosoma a la diana de corte y empalme correcta, mediante la unión a secuencias específicas de ARN en los exones, y reclutando a continuación las RNPsn U1 y U2 a los sitios apropiados del pre-ARNm, mediante interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, los factores de corte y empalme SR se unen a secuencias específicas de los exones y actúan reclutando al snRNP U1 al punto de corte y empalme 5′ (Fig. 7.52). Las proteínas SR también interaccionan con otro factor de corte y empalme (U2AF), que se une a las secuencias ricas en pirimidina en los puntos de corte y empalme 3′ y recluta la snRNP U2 al punto de ramificación. Además de reclutar a los componentes del espliceosoma al pre-ARNm, los factores de corte y empalme acoplan el corte y empalme a la transcripción mediante su asociación con el CTD fosforilado de la ARN polimerasa II. Este anclaje de la maquinaria de corte y empalme a la ARN polimerasa se cree que es importante para asegurar que los exones se unan en el orden correcto a medida que se sintetiza el pre-ARNm.

Corte y empalme alternativo

El papel central de los mecanismos de corte y empalme en la maduración del pre-ARNm abre la posibilidad de regular la expresión génica por medio del control de la maquinaria celular que los lleva a cabo. Dado que muchos pre-ARNm contienen múltiples intrones, pueden producirse distintos ARNm partiendo del mismo gen combinando los sitios de corte 5′ y 3′. La posibilidad de combinar los exones aporta un nuevo modo de controlar la expresión génica generando múltiples ARNm (y por tanto múltiples proteínas) a partir del mismo pre-ARNm. Este proceso, denominado **corte y empalme alternativo** (o *splicing* alternativo) ocurre de forma habitual en los genes de eucariotas superiores. Por ejemplo, se estima que más del 50% de los genes humanos producen tránscritos que sufren corte y empalme alternativo, que podría dar lugar a un aumento notable de la diversidad de proteínas que pueden ser codificadas por los 20.000-25.000 genes estimados de los genomas de mamíferos. Puesto que los patrones de corte y empalme alternativos pueden variar entre los distintos tejidos y en respuesta a señales

■ **Se estima que el corte y empalme aberrante puede causar hasta el 15% de todas las enfermedades hereditarias. Esto incluye patologías como la β-talasemia y diversos tipos de cáncer.**

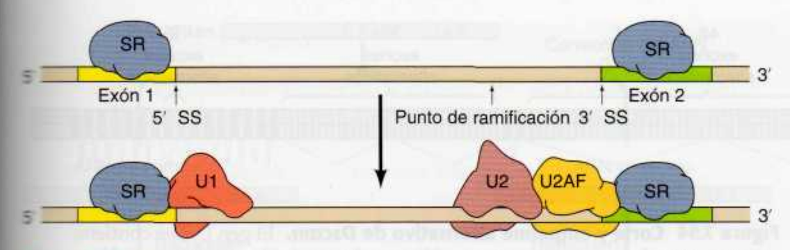


Figura 7.52 Papel de los factores de corte y empalme en el ensamblaje del espliceosoma. Los factores de corte y empalme (proteínas SR) se unen a secuencias específicas en los exones. Las proteínas SR reclutan la RNPsn U1 al sitio de corte 5′ y un factor de corte y empalme adicional (U2AF) al punto de corte 3′. A continuación U2AF recluta a RNPsn U2 al punto de ramificación.

extracelulares, el corte y empalme alternativo proporciona un importante mecanismo de regulación de la expresión génica con especificidad tisular y del desarrollo.

Un ejemplo bien estudiado del procesamiento alternativo específico de tejidos lo proporciona la determinación del sexo en *Drosophila*, donde el corte y empalme alternativo del mismo pre-ARNm determina si la mosca es macho o hembra (Fig. 7.53). El corte y empalme alternativo del pre-ARNm de un gen denominado *transformador* está controlado por una proteína (SXL) que sólo se expresa en las moscas hembra. El pre-ARNm *transformador* posee tres exones, pero un segundo exón distinto entre ambos sexos se incorpora en el ARNm como resultado del uso de puntos de corte y empalme alternativos en 3′. En los machos, el exón 1 se une al sitio de corte y empalme situado más corriente arriba de estos sitios 3′, que es seleccionado mediante la unión del factor de corte y empalme U2AF. En las hembras, la proteína SXL se une al sitio de corte y empalme 3′, bloqueando la unión de U2AF. Como consecuencia, el sitio de corte y empalme corriente arriba se

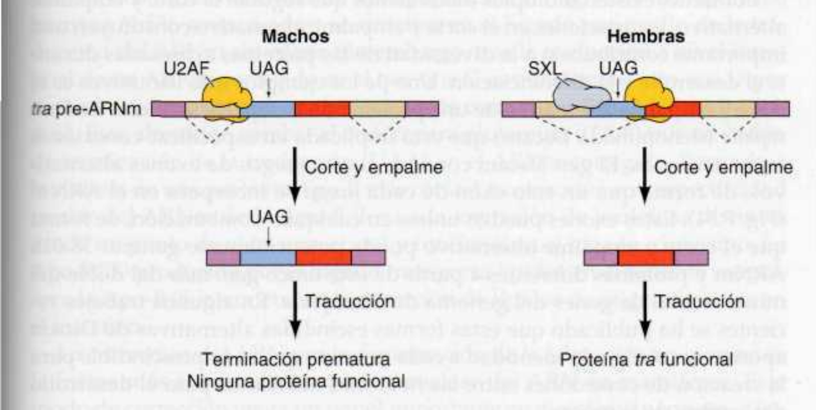


Figura 7.53 Corte y empalme alternativo en la determinación sexual de *Drosophila*. El corte y empalme alternativo del ARNm *transformador (tra)* está regulado por la proteína SXL, que sólo se expresa en las moscas hembra. En los machos, el primer exón del ARNm *tra* se une a un punto de corte y empalme 3′ que da lugar a un segundo exón que contiene un codón de terminación para la traducción (UAG), de modo que no se expresa ninguna proteína *tra*. En las hembras, la unión de la proteína SXL bloquea la unión de U2AF a este punto de corte y empalme 3′, resultando en el uso de un sitio alternativo más adelante en el exón 2. Este punto de corte y empalme alternativo en 3′ se encuentra después del codón de terminación para la traducción, de modo que el ARNm expresado en las hembras dirige la síntesis de una proteína *tra* funcional.

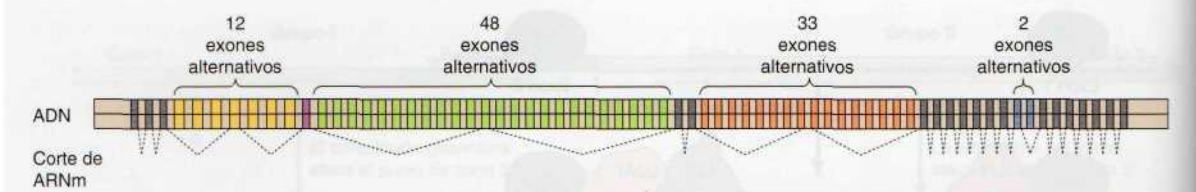


Figura 7.54 Corte y empalme alternativo de *Dscam*. El gen *Dscam* contiene cuatro juegos de exones alternativos: 12 para el exón 4, 48 para el exón 6, 33 para el exón 9, y 2 para el exón 17. Cualquier exón de cualquiera de estos juegos puede ser incorporado en el ARNm madura, de forma que el corte y empalme alternativo puede producir un total de 38.016 ARNm diferentes (12 × 48 × 33 × 2 = 38.016).

■ **El oído de un mamífero contiene células pilosas que están preparadas para responder a sonidos de diferentes frecuencias. Se cree que este fenómeno está mediado en parte por el corte y empalme alternativo de un gen que codifica una proteína canal.**

salta en las hembras, y el exón 1 se une a un sitio de corte y empalme 3′ alternativo que se encuentra corriente abajo. Las secuencias del exón 2 incluídas en el ARNm *transformador* contienen un codón de terminación de la traducción, de modo que no se produce ninguna proteína. Este codón de terminación no está incluido en el ARNm femenino, de modo que las moscas hembra expresan la proteína *transformadora* funcional, que actúa como un regulador clave en la determinación del sexo.

El corte y empalme alternativo de *transformer* ilustra la acción de un represor (la proteína SXL) que funciona bloqueando la unión de un factor de corte y empalme (U2AF), y un gran grupo de proteínas regulan de forma similar el corte y empalme mediante la unión a secuencias silenciadoras de los pre-ARNm. En otros casos, el corte y empalme alternativo está controlado por activadores que reclutan los factores de corte empalme para que actúa sobre sitios que de otro modo no serían reconocidos. Los activadores de corte y empalme mejor estudiados son los miembros de la familia de proteínas SR (véase Fig. 7.52), que se unen a secuencias específicas potenciadoras del corte y empalme.

Por tanto, existen múltiples mecanismos que regulan el corte y empalme alternativo, y variaciones en el corte y empalme alternativo constituyen una importante contribución a la diversidad de las proteínas expresadas durante el desarrollo y la diferenciación. Uno de los ejemplos más llamativos es el corte y empalme alternativo de una proteína de la superficie celular de *Drosophila* (denominada Dscam) que está implicada en especificar conexiones entre neuronas. El gen Dscam contiene cuatro juegos de exones alternativos, de forma que un solo exón de cada juego se incorpora en el ARNm (Fig. 7.54). Estos exones pueden unirse en cualquier combinación, de forma que el corte y empalme alternativo puede potencialmente generar 38.016 ARNm y proteínas diferentes a partir de este único gen: más del doble del número total de genes del genoma de *Drosophila*. En algunos trabajos recientes se ha publicado que estas formas escindidas alternativas de Dscam aportan un código de identidad a cada neurona que es imprescindible para la creación de conexiones entre las neuronas necesarias para el desarrollo del cerebro de la mosca.

Corrección del ARN

La **correción del ARN** (o en inglés *RNA editing*) se define como los procesos de maduración (aparte del corte y empalme) que alteran las secuencias codificadoras de proteínas de algunos ARNm. Esta inesperada forma de maduración de ARN fue descrita por primera vez en ARNm mitocondriales de tripanosomas, en los que se añadían y eliminaban residuos de U en múltiples sitios junto con el pre-ARNm para generar el ARNm. Más recientemente, la corrección ha sido descrita en ARNm mitocondriales de otros organis-

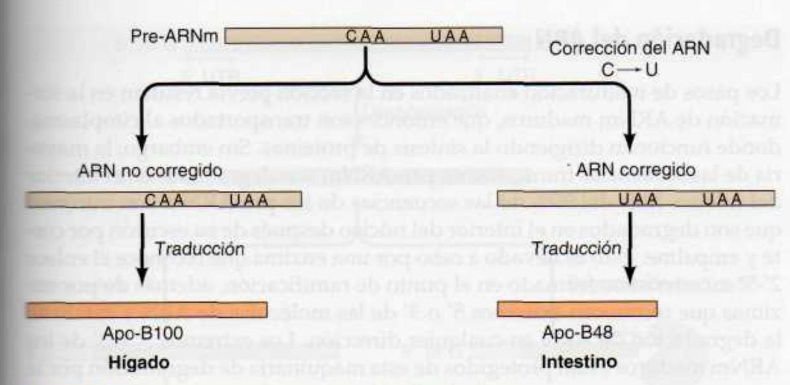


Figura 7.55 ***Edición del ARNm de la apolipoproteína B.*** *En el hígado humano se* traduce un ARNm no corregido, obteniéndose una proteína de 4.536 aminoácidos llamada Apo-B100. En el intestino humano, por el contrario, se corrige este ARNm mediante una modificación de bases que sustituye una C determinada por un U. Esta modificación transforma el codón de glutamina (CCA) en un codón de terminación (UAA), por lo que la síntesis proteínica se acorta dando lugar a la Apo-B48, con 2.152 aminoácidos.

mos, ARNm cloroplásticos de plantas superiores y ARNm nucleares de genes animales.

La corrección de ARNm nucleares animales, así como de ARN mitocondriales y cloroplásticos de plantas superiores, implica cambios de bases únicos como resultado de reacciones de modificación de bases similares a las que ocurren en la maduración de ARNt. En células animales las reacciones de corrección incluyen la desaminación de citosina a uridina y de adenosina a inosina. Uno de los ejemplos mejor estudiados es la corrección del ARNm de la apolipoproteína B, que transporta lípidos en la sangre. En este caso, la corrección con especificidad tisular del ARN da lugar a la producción de dos formas distintas de apolipoproteína B (Fig. 7.55). La Apo-B100 humana (4.536 aminoácidos) se sintetiza en el hígado por medio de la traducción del ARNm sin editar. Sin embargo, tras la traducción a nivel intestinal de un ARNm corregido en el que una C es transformada en una U por desaminación se obtiene una proteína más corta (Apo-B48, 2.152 aminoácidos). Esta alteración cambia el codón para glutamina (CAA) por un codón de terminación de la traducción (UAA) en el ARNm corregido, llevando a la síntesis de una proteína Apo-B más corta. La corrección con especificidad tisular del ARNm de la Apo-B lleva a la expresión de proteínas distintas desde un punto de vista estructural y funcional en el hígado e intestino. La Apo-B100 producida por el hígado transporta lípidos en el torrente sanguíneo; la Apo-B48 interviene en la absorción de lípidos de origen dietético en el intestino.

La corrección del ARN por la deaminación de la adenosina en inopina es la forma más común de corrección nuclear del ARN en mamíferos. Este modo de corrección juega un papel importante en el sistema nervioso, donde la corrección de A-a-I resulta en cambios sencillos de aminoácido en los receptores para algunas moléculas señalizadoras en la superficie de las neuronas. Por ejemplo, los ARNm que codifican receptores del neurotransmisor serotonina pueden ser editados en hasta cinco sitios, potencialmente generando 24 versiones diferentes del receptor con diferentes actividades señalizadoras. La importancia de la edición A-a-I en el sistema nervioso se demuestra adicionalmente por el descubrimiento de que mutantes de *C. elegans*, *Drosophila* y ratones carecientes de la enzima editora sufren una diversidad de defectos neurológicos.

Degradación del ARN

Los pasos de maduración analizados en la sección previa resultan en la formación de ARNm maduros, que entonces son transportados al citoplasma, donde funcionan dirigiendo la síntesis de proteínas. Sin embargo, la mayoría de las secuencias transcritas en pre-ARNm son degradadas en el interior del núcleo. Más del 90% de las secuencias de los pre-ARNm son intrones, que son degradados en el interior del núcleo después de su escisión por corte y empalme. Esto es llevado a cabo por una enzima que reconoce el enlace 2′-5′ característico formado en el punto de ramificación, además de por enzimas que reconocen extremos 5′ o 3′ de las moléculas de ARN y catalizan la degradación de ARN en cualquier dirección. Los extremos 5′ y 3′ de los ARNm maduros están protegidos de esta maquinaria de degradación por la presencia de caperuzas y poliadenilación, respectivamente, mientras que los extremos no protegidos de los intrones son reconocidos y degradados.

Además de degradar intrones, las células poseen un sistema de control de calidad que detectan y degradan ARNm aberrantes generados por error en el transcurso de la transcripción. El mecanismo de control mejor estudiado es el **decaimiento de ARNm mediado sin sentido**, que provoca la degradación de ARNm que carecen de marcos completos de lectura abierta. Este mecanismo suprime moléculas aberrantes de ARNm y evita la síntesis de proteínas truncadas anómalas. El decaimiento de ARNm mediado sin sentido se pone en marcha cuando los ribosomas detectan codones de terminación prematuros, de modo que se interrumpe la traducción y se degradan las moléculas defectuosas de ARNm.

Lo que podría considerarse como el aspecto final de la maduración de una molécula de ARN es su eventual degradación en el citoplasma. Puesto que el nivel intracelular de ARN está determinado por un equilibrio entre la síntesis y la degradación, la tasa de degradación de ARN individuales es otro nivel al que puede controlarse la expresión génica. Tanto los ARN ribosómicos como los de transferencia son muy estables, y esta estabilidad es la principal responsable de los niveles elevados de estos ARN (superior al 90% de todo el ARN) tanto en células procarióticas como eucarióticas. Por el contrario, los ARNm bacterianos se degradan rápidamente, poseyendo generalmente una vida media de tan sólo 2 a 3 minutos. Esta rápida renovación de ARNm bacterianos permite a la célula responder rápidamente a modificaciones en su entorno, como cambios en la disponibilidad de nutrientes requeridos para el crecimiento.

No obstante, en las células eucarióticas las distintas moléculas de ARNm se degradan a una velocidad diferente, lo que crea otro parámetro de regulación de la expresión génica en eucariotas. Las vidas medias de los ARNm en las células de mamífero varían desde 30 minutos hasta unas 20 horas. Los ARNm inestables suelen codificar proteínas reguladoras, como factores de transcripción, cuyas concentraciones intracelulares cambian con rapidez como respuesta a estímulos ambientales. Por el contrario, los ARNm que codifican proteínas estructurales suelen tener vidas medias más largas.

La degradación citoplasmática de la mayoría de los ARNm eucarióticos comienza con el acortamiento de sus colas poli-A (Fig. 7.56). A continuación, estos ARNm desadenilados son degradados por nucleasas que actúan a partir del extremo 3′ o la eliminación de la caperuza en 5′. Con frecuencia, los ARN degradados con rapidez contienen secuencias específicas ricas en AU cerca de sus extremos 3′ que actúan como sitios de unión de proteínas que pueden estabilizar estos ARNm o bien marcarlos para inducir su degradación. Las actividades de estas proteínas de unión a ARN se regulan por medio de señales extracelulares, como factores de crecimiento y hormonas, de modo que las células son capaces de controlar las velocidades de degra-

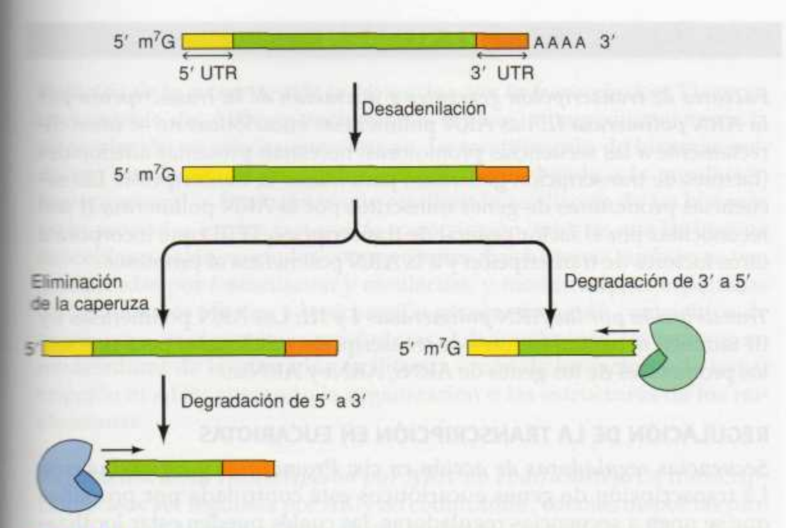


Figura 7.56 Degradación del ARNm. La degradación del ARNm suele comenzar con el acortamiento de la cola de poli-A (desadenilación), lo que se sigue de la eliminación de la caperuza de 5′ del extremo 5′ (degradación de 5′ a 3′) o bien de la degradación del extremo 3′ (degradación de 3′ a 5′).

dación de ciertos ARNm como respuesta a las condiciones ambientales. Por otra parte, los ARNsi (véase Fig. 4.42) y los ARNmi, que controlan la estabilidad y la traducción del ARNm (como se explica en el Cap. 8), regulan la degradación de algunos ARNm. Por tanto, a pesar de que la transcripción representa el primer nivel de regulación de la expresión génica, las variaciones de la velocidad de degradación del ARNm juegan un papel destacado en el control de las concentraciones estacionarias de esta molécula en el interior celular.

RESUMEN

TRANSCRIPCIÓN EN PROCARIOTAS

ARN polimerasa y transcripción: La ARN polimerasa de *E. coli* consta de subunidades α, β, β′, ω y σ. La transcripción se inicia por la unión de σ a las secuencias promotoras. Tras la síntesis de los primeros nucleótidos del ARN, el núcleo de la polimerasa se separa de σ y viaja a lo largo del molde de ADN a medida que alarga la cadena de ARN. La transcripción continúa hasta que la polimerasa encuentra una señal de terminación.

Represores y control negativo de la transcripción: El prototipo de regulación génica en bacterias es el operón *lac*, controlado por la unión de un represor a secuencias específicas del ADN cercanas al promotor.

Control positivo de la transcripción: Algunos genes bacterianos son regulados mediante activadores transcripcionales en vez de represores.

ARN POLIMERASAS EUCARIÓTICAS Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN GENERALES

ARN polimerasas eucarióticas: Las células eucarióticas contienen tres ARN polimerasas nucleares distintas, que transcriben genes que codifican ARNm y ARNmi (polimerasa II), ARNr (polimerasas I y II) y ARNt (polimerasa III).

PALABRAS CLAVE

ARN polimerasa, promotor, técnica del *footprinting del ADN*

operón, operador, represor, elemento de control *cis*-actuante, factor *trans*-actuante

PALABRAS CLAVE / RESUMEN

factor de transcripción, factor de transcripción general, secuencia TATA, proteína de unión a TATA (TBP), factor asociado a TBP (TAF), Mediador

Factores de transcripción generales e iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II: Las ARN polimerasas eucarióticas no se unen directamente a las secuencias promotoras; necesitan proteínas adicionales (factores de transcripción generales) para iniciar la transcripción. Las secuencias promotoras de genes transcritos por la ARN polimerasa II son reconocidas por el factor general de transcripción TFIID que incorpora a otros factores de transcripción y a la ARN polimerasa al promotor.

Transcripción por las ARN polimerasas I y III: Las ARN polimerasas I y III también necesitan factores de transcripción adicionales para unirse a los promotores de los genes de ARNr, ARNt y ARNsn.

REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN EUCARIOTAS

estimuladores, aislador, elemento barrera

Secuencias reguladoras de acción en cis: *Promotores y estimuladores:* La transcripción de genes eucarióticos está controlada por proteínas que se unen a secuencias reguladoras, las cuales pueden estar localizadas a más de 50 kb del sitio de inicio de la transcripción. Los estimuladores contienen de forma característica sitios de unión para múltiples proteínas que actúan conjuntamente en la regulación de la expresión génica.

ensayo de variación de la *movilidad electroforética*, inmunoprecipitación cromática

Sitios de unión para factores de transcripción: Los factores de transcripción eucariotas se unen a secuencias cortas de ADN, generalmente de 6-10 pares de bases, presentes en promotores o en secuencias potenciadoras (*enhancers*).

cromatografía de afinidad al ADN

Proteínas reguladoras de la transcripción: Se han aislado muchos factores transcripcionales eucarióticos gracias a su unión a secuencias específicas de ADN.

activador transcripcional, dominio en dedos de cinc, receptor de hormona esteroidea, hélice-giro-hélice, dominio homeo, cremallera de leucinas, hélice-bucle-hélice, coactivador

Estructura y función de los activadores transcripcionales: Los activadores transcripcionales son proteínas modulares que contienen dominios diferentes de unión al ADN y de activación. Los dominios de unión al ADN median la asociación con secuencias reguladoras específicas; los dominios de activación estimulan la transcripción interaccionando con proteínas Mediadoras y con factores de transcripción generales, además de con coactivadores que modifican la estructura cromatínica.

correpresor

Represores eucarióticos: La expresión génica en células eucarióticas está regulada tanto por represores como por activadores. Algunos represores interfieren en la unión de activadores o factores de transcripción generales al ADN. Otros represores contienen dominios de represión que inhiben la transcripción interaccionando con factores de transcripción generales, activadores transcripcionales, o correpresores que afectan a la estructura cromatínica.

Regulación de la elongación: La transcripción se regula tanto al nivel de la elongación como de la iniciación. En muchos genes, las moléculas de polimerasa II que han comenzado a transcribirlos se han detenido poco después del promotor. Estas polimerasas detenidas reanudarán la transcripción tan pronto como reciba las señales extracelulares adecuadas.

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

Relación de la estructura de la cromatina con la transcripción: El empaquetamiento del ADN en nucleosomas supone un impedimento para la transcripción en células eucarióticas. La modificación de histonas mediante acetilación se encuentra estrechamente ligada a la regulación transcripcional, y las enzimas que catalizan la acetilación de las histonas están asociadas con los factores de transcripción, mientas que las histona deacetilasas están asociadas con represores. Las histonas también se ven modificadas por fosforilación y metilación, y modificaciones específicas de las histonas afectan a la expresión génica sirviendo como sitios de unión para otras proteínas reguladoras. Adicionalmente, los factores remodeladores de la cromatina facilitan la unión de los factores de transcripción al ADN alterando la organización o las estructuras de los nucleosomas.

Las proteínas HMG, acetilación de histonas, herencia epigenética, factor remodelador de la cromatina, factor remodelador del nucleosoma, factor de elongación

Regulación de la transcripción por ARN no codificantes: La transcripción puede ser regulada por ARN no codificantes, además de por las proteínas reguladoras. Los microARN reprimen la transcripción de genes homólogos mediante su asociación con un complejo proteico (RITS) que induce modificaciones en las histonas resultando en la formación de heterocromatina. La inactivación del cromosoma X proporciona un ejemplo de regulación génica por ARN no codificante en mamíferos.

inactivación del cromosoma X

Metilación del ADN: La metilación de los residuos de citosina puede inhibir la transcripción de genes eucariotas y es importante para el silenciamiento de los elementos transponibles. La regulación de la expresión génica mediante metilación desempeña un importante papel en la impresión genómica, que controla la transcripción de algunos genes relacionados con el desarrollo de mamíferos.

impresión genómica

MADURACIÓN Y RENOVACIÓN DEL ARN

Maduración de los ARN ribosómico y de transferencia: Los ARN ribosómico y de transferencia proceden del corte de un largo transcrito primario, tanto en células procarióticas como eucarióticas. En los ARNr se añaden grupos metilo, y se modifican varias bases en los ARNt.

pre-ARNr, pre-ARNt, ARNasa P, ribozima

Maduración del ARNm en eucariotas: Los pre-ARNm eucarióticos se modifican con la adición de casquetes o cap de 7-metilguanosina y colas de poli-A en 3′, además de la extracción de los intrones mediante corte y empalme.

pre-ARNm, casquete o cap de 7-metilguanosina, cola de poli-A, poliadenilación

Mecanismos de corte y empalme: El corte de los pre-ARNm nucleares se lleva a cabo en grandes complejos llamados espliceosomas, formados por proteínas y pequeños ARN nucleares (ARNsn). Los ARNsn reconocen secuencias en los puntos de corte de los pre-ARNm y catalizan la escisión. Algunos ARN mitocondriales, cloroplásticos y bacterianos tienen la habilidad de ser autoempalmantes, ya que el proceso está catalizado por secuencias de los intrones.

espliceosoma, pequeño ARN nuclear (ARNsn), partícula ribonucleica pequeña nuclear (RNPsn), autoempalme

Corte y empalme alternativo: Pueden unirse los exones en diferentes combinaciones según sea el tipo de corte y empalmado, lo que supone un importante mecanismo en eucariotas complejos para el control de la expresión génica específica de tejido.

corte y empalme alternativo

PALABRAS CLAVE

corrección de ARN

decaimiento de ARNm mediado sin sentido

RESUMEN

Corrección del ARN: Algunos ARNm son modificados mediante procesos que alteran sus secuencias de codificación de proteínas. La corrección de ARNm mitocondriales en algunos protozoos incluye la adición y deleción de residuos de U en múltiples puntos de la molécula. Otras formas de edición del ARN en células de plantas y mamíferos consisten en la modificación de bases específicas.

Degradación del ARN: Los intrones son degradados en el interior del núcleo y los ARNm anómalos que carecen de marcos de lectura abiertos completos son eliminados por decaimiento del ARNm mediado sin sentido. Los ARNm funcionales en las células eucarióticas son degradados a diferentes velocidades, proporcionando un mecanismo adicional de control de la expresión génica. En algunos casos, las tasas de degradación del ARNm están reguladas por señales extracelulares.

Preguntas

1. ¿Cómo identifica el *footprinting* o toma de huellas un sitio de unión a proteínas en el ADN?

2. ¿Qué papel juegan los factores sigma (σ) en la síntesis de ARN bacteriano?

3. ¿Cuál es el mecanismo principal de terminación de ARNm de *E. coli*?

4. ¿Cómo influye el represor *lac* en la transcripción del operón *lac*?

5. Está comparando, para la transcripción basal *in vitro*, las necesidades de dos genes de polimerasa II, uno que contiene la secuencia TATA y el otro que tan sólo contiene una secuencia Inr. La transcripción con estos promotores, ¿requiere la presencia de TBP o de TFIID?

6. ¿Cómo difieren los estimuladores o *enhancers* de los promotores como las secuencias de regulación en *cis* en eucariotas?

7. Está estudiando el estimulador de un gen que normalmente sólo se expresa en neuronas. En los modelos en los que este estimulador está ligado a un gen reportero existe expresión en células neuronales pero no en fibroblastos. Sin embargo, si muta un elemento secuencial específico dentro del estimulador, aparece la expresión tanto en células neuronales como en fibroblastos. ¿Qué tipo de proteína reguladora esperaría que se uniera a ese elemento estimulador?

8. ¿Cuál es la función de los aisladores?

9. Explica el mecanismo de la inactivación del cromosoma X en las mujeres.

10. ¿Qué propiedad de Sp1 fue explotada para su purificación mediante cromatografía de afinidad de ADN? ¿Cómo determinarías que la proteína purificada es, efectivamente, Sp1?

11. Has desarrollado una reacción de corte y empalme *in vitro* en el que el ARNm inicial es procesado para dar el ARNm maduro. ¿Qué resultados esperarías si añadieses un antisuero anti-Sm a la reacción?

12. ¿Cómo pueden regular los ARN no codificantes la concentración de un ARNm específico dentro de una célula?

13. ¿Cuál es la función de los factores de corte y empalme que no son componentes de los RNPsn?

14. ¿Cómo se sintetizan dos formas de apolipoproteína B estructural y funcionalmente diferentes en el hígado e intestino humanos?

15. ¿Qué es el decaimiento mediado por ARNm sin sentido? ¿Cuál es su relevancia en la célula?

Bibliografía

Transcripción en procariotas

Borukhov, S., J. Lee and O. Laptenko. 2005. Bacterial transcription elongation factors: New insights into molecular mechanism of action. *Molec. Microbiol.* 55: 1315–1324. [R]

Borukhov, S. and E. Nudler. 2003. RNA polymerase holoenzyme: Structure, function and biological implications. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 93–100. [R]

Gilbert, W. and B. Muller-Hill. 1966. Isolation of the *lac* repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 1891–1899. [P]

Greive, S. J. and P. H. von Hippel. 2005. Thinking quantitatively about transcriptional regulation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 221–232. [R]

Jacob, F. and J. Monod. 1961. Genetic and regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318–356. [P]

Lawson, C. L., D. Swigon, K. S. Murakami, S. A. Darst, H. M. Berman and R. H. Ebright. 2004. Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 14: 10–20. [R]

Mathew, R. and D. Chetterji. 2006. The evolving story of the *w* subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbiol.* 14: 450–455. [R]

Mooney, R. A., S. A. Darst and R. Landick. 2005. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell* 20: 335–345. [R]

Murakami, K. S. and S. A. Darst. 2003. Bacterial RNA polymerases: The wholo story. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 13: 31–39. [R]

Murakami, K. S., S. Masuda and S. A. Darst. 2002. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* 296: 1280–1284. [P]

Ptashne, M. and A. Gann. 2002. Genes and Signals. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Richardson, J. P. 2003. Loading Rho to terminate transcription. *Cell* 114: 157–159. [R]

Vassylyev, D. G., S. Sekine, O. Laptenko, J. Lee, M. N. Vassylyeva, S. Borukhov and S. Yokoyama. 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme

at 2.6 Å resolution. *Nature* 417: 712–719. [P]

Wilson, C. J., H. Zhan, L. Swint-Kruse and K. S. Matthews. 2007. The lactose repressor system: paradigms for regulation, allosteric behavior and protein folding. *Cell. Mol. Life. Sci.* 64: 3–16. [R]

Zhang, G., E. A. Campbell, E. A., L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov and S. A. Darst. 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98: 811–824. [P]

ARN polimerasas eucarióticas y factores de transcripción generales

Amaral, P. P., M. E. Dinger, T. R. Mercer and J. S. Mattick. 2008. The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science* 319: 1787–1789. [R]

Bushnell, D. A., K. D. Westover, R. E. Davis and R. D. Kornberg. 2004. Structural basis of transcription: An RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Angstroms. *Science* 303: 983–988. [P]

Conaway, J. W., L. Florens, S. Sato, C. Tomomori-Sato, T. J. Parmely, T. Yao, S. K. Swanson, C. A. S. Banks, M. P. Washburn and R. C. Conaway. 2005. The mammalian Mediator complex. *FEBS Lett.* 579: 904–908. [R]

Cramer, P., D. A. Bushnell and R. D. Kornberg. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science* 292: 1863–1876. [P]

Ebright, R. H. 2000. RNA polymerase: Structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* 304: 687–698. [R]

Orphanides, G. and D. Reinberg. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* 108: 439–451. [R]

Russell, J. and J. C. B. M. Zomerdijk. 2005. RNA polymerase I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem. Sci.* 30: 87–96. [R]

Sandelin, A., P. Carninci, B. Lenhard, J. Ponjavic, Y. Hayashizaki and D. A. Hume. 2007. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nature Rev. Genet.* 8: 424–436. [R]

Schramm, L. and N. Hernandez. 2002. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* 16: 2593–2620. [R]

Weil, P. A., D. S. Luse, J. Segall and R. G. Roeder. 1979. Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 18: 469–484. [P]

Regulación de la transcripción en eucariotas

Bayne, E. H. and R. C. Allshire. 2005. RNA-directed transcriptional gene silencing in mammals. *Trends Genet.* 21: 370–373. [R]

Belosserkovskaya, R. and D. Reinberg. 2004. Facts about FACT and transcript elongation through chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 139–146. [R]

Berger, S. L. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447: 407–412. [R]

Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi

Grewal, S. I. S. and S. C. R. Elgin. 2007. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447: 399–406. [R]

Heard, E. and C. M. Disteche. 2006. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev.* 20: 1848–1867. [R]

Henikoff, S. 2008. Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nature Rev. Genet.* 9: 15–26. [R]

Hock, R., T. Furusawa, T. Ueda and M. Bustin. 2007. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol.* 17: 72–79. [R]

Jenuwein, T. and C. D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* 293: 1074–1080. [R]

Kadonaga, J. T. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 116: 247–257. [R]

Kadonaga, J. T. and R. Tjian. 1986. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5889–5893. [P]

Kim, T. H. and B. Ren. 2006. Genome-wide analysis of protein-DNA interactions. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7:81–102. [R]

Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693–705. [R]

Li, B., M. Carey and J. L. Workman. 2007. The role of chromatin during transcription.

Saunders, A., L. J. Core and J. T. Lis. 2006. Breaking barriers to transcription elongation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 557–567. [R]

Sims, R. J. III, R. Belotserkovskaya and D. Reinberg. 2004. Elongation by RNA polymerase II: The short and long of it. *Genes Dev.* 18: 2437–2468. [R]

Staudt, L. M. and M. J. Lenardo. 1991. Immunoglobulin gene transcription. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 373–398. [R]

Taunton, J., C. A. Hassig and S. L. Schreiber. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272: 408–411. [P]

Teixeira da Rocha, S. and A. C. Ferguson-Smith. 2004. Genomic imprinting. *Curr. Biol.* 14: R646–649. [R]

Workman, J. L. 2006. Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev.* 20: 2009–2017. [R]

Maduración y renovación del ARN

Abelson, J., C. R. Trotta and H. Li. 1998. tRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 273:12685–12688. [R]

Ben-Dov, C., B. Hartmann, J. Lundgren and J. Valcarcel. 2008. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 283: 1229–1233. [R]

Black, D. L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Ann. Rev. Biochem.* 72: 291–336. [R]

Blanc, V. and N. O. Davidson. 2003. C-to-U RNA editing: Mechanisms leading to genetic diversity. *J. Biol. Chem.* 278: 1395–1398. [R]

Evans, D., S. M. Marquez and N. R. Pace. 2006. RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem. Sci.* 31: 333–341. [R]

Garneau, N. L., J. Wilusz and C. J. Wilusz. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 113–126. [R]

Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace and S. Altman. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849–857. [P]

Haugen, P., D. M. Simon and D. Bhattacharya. 2005. The natural history of group I introns. *Trends Genet.* 21: 111–119. [R]

Hirose, Y. and Y. Ohkuma. 2007. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eukaryotic gene expression. *J. Biochem.* 141: 601–608. [R]

Hopper, A. K. and E. M. Phizicky. 2003. tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev.* 17: 162–180. [R]

House, A. E. and K. W. Lynch. 2008. Regulation of alternative splicing: more than just ABCs. *J. Biol. Chem.* 283: 1217–1221. [R]

Isken, O. and L. E. Maquat. 2007. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.* 21: 1833–1856. [R]

Kornblihtt, A. R., M. de la Mata, J. P. Fededa, M. J. Munoz and G. Nogues. 2004. Multiple links between transcription and splicing. *RNA* 10: 1489–1498. [R]

Kruger, K., P. J. Grabowski, A. Zaug, A. J. Sands, D. E. Gottschling and T. R. Cech. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31: 147–157. [P]

Maas, S., A. Rich and K. Nishikura. 2003. A-to-I RNA editing: Recent news and residual mysteries. *J. Biol. Chem.* 278: 1391–1394. [R]

Matlin, A. J., F. Clark and C. W. J. Smith. 2005. Understanding alternative splicing: Towards a cellular code. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 386–398. [R]

Maydanovych, O. and P. A. Beal. 2006. Breaking the central dogma by RNA editing. *Chem. Rev.* 106: 3397–3411. [R]

Padgett, R. A., M. M. Konarska, P. J. Grabowski, S. F. Hardy and P. A. Sharp. 1984. Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* 225: 898–903. [P]

Padgett, R. A., S. M. Mount, J. A. Steitz and P. A. Sharp. 1983. Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* 35: 101–107. [P]

Phatnani, H. P. and A. L. Greenleaf. 2006. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev.* 20: 2922–2936. [R]

Proudfoot, N. J. 2004. New perspectives on connecting messenger RNA 3′ end formation to transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 272–278. [R]

Schmucker, D. 2007. Molecular diversity of Dscam: recognition of molecular identity in neuronal wiring. *Nature Rev. Neurosci.* 8: 915–920. [R]

Seeburg, P. H. and J. Hartner. 2003. Regulation of ion channel/neurotransmitter receptor function by RNA editing. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 279–283. [R]

Shin, C. and J. L. Manley. 2004. Cell signaling and the control of pre-mRNA splicing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 727–738. [R]

Stetefeld, J. and M. A. Ruegg. 2005. Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* 30: 515–521. [R]

Stuart, K. D., A. Schnaufer, N. L. Ernst and A. K. Panigrahi. 2005. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem. Sci.* 30: 97–105. [R]

Valadkhan, S. 2007. The spliceosome: a ribozyme at heart? *Biol. Chem.* 388: 693–697. [R]

Weiner, A. M. 2004. tRNA maturation: RNA polymerization without a nucleic acid template. *Curr. Biol.* 14: R883–R885. [R]

CAPÍTULO 8

Síntesis de proteínas, procesamiento y regulación

A LA TRANSCRIPCIÓN Y AL PROCESAMIENTO DEL ARN LES SIGUE LA TRADUCCIÓN, es decir, la síntesis de proteínas guiada por un molde de ARNm. Las proteínas son los mediadores activos en la mayoría de los procesos celulares, llevando a cabo las funciones determinadas por la información codificada en el ADN genómico. La síntesis de proteínas es la etapa final de la expresión génica. Sin embargo, la traducción del ARNm es sólo el primer paso en la constitución de una proteína funcional. La cadena polipeptídica se debe plegar en una conformación tridimensional adecuada y, con frecuencia, ésta es procesada antes de dar lugar a la forma activa. El procesamiento, especialmente en eucariotas, está muy relacionado con el transporte de las distintas proteínas a su destino final dentro de la célula.

La expresión génica no regula exclusivamente a nivel de la transcripción (véase Cap. 7), sino también al de la traducción, y este control es un elemento destacado de la regulación génica tanto en las células procarióticas como en las eucarióticas. Sin embargo, un mayor significado tienen los mecanismos que controlan la actividad de las proteínas en la célula. Una vez sintetizadas, la mayoría de las proteínas pueden ser reguladas, en respuesta a señales extracelulares, ya sea por modificaciones covalentes o mediante asociación con otras moléculas en el interior de la célula. Además, el nivel de las proteínas en la célula se regula a través de una degradación de proteínas diferencial. En definitiva, estos sistemas de control de la cantidad y actividad de las proteínas intracelulares regulan todos los aspectos del comportamiento celular.

Traducción del ARNm

Las proteínas se sintetizan a partir de un molde de ARNm mediante un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución (tratado en el Cap. 4). Todos los ARNm se leen en dirección 5′-3′, y las cadenas polipeptídicas se sintetizan desde el extremo amino terminal al carboxilo terminal. Cada aminoácido viene codificado por tres bases (un codón) en el ARNm, de acuerdo con el carácter casi universal del código genético. El mecanismo fundamental de la síntesis de proteínas es básicamente el mismo en todas las células: la traducción tiene lugar en los ribosomas, siendo los ARNt los adaptadores entre el molde de ARNm y los aminoácidos incorporados a la proteína. La síntesis de proteínas, por tanto, implica la interacción entre tres tipos de moléculas de ARN (el molde de ARNm, ARNt y ARNr) además de varias proteínas necesarias para la traducción.

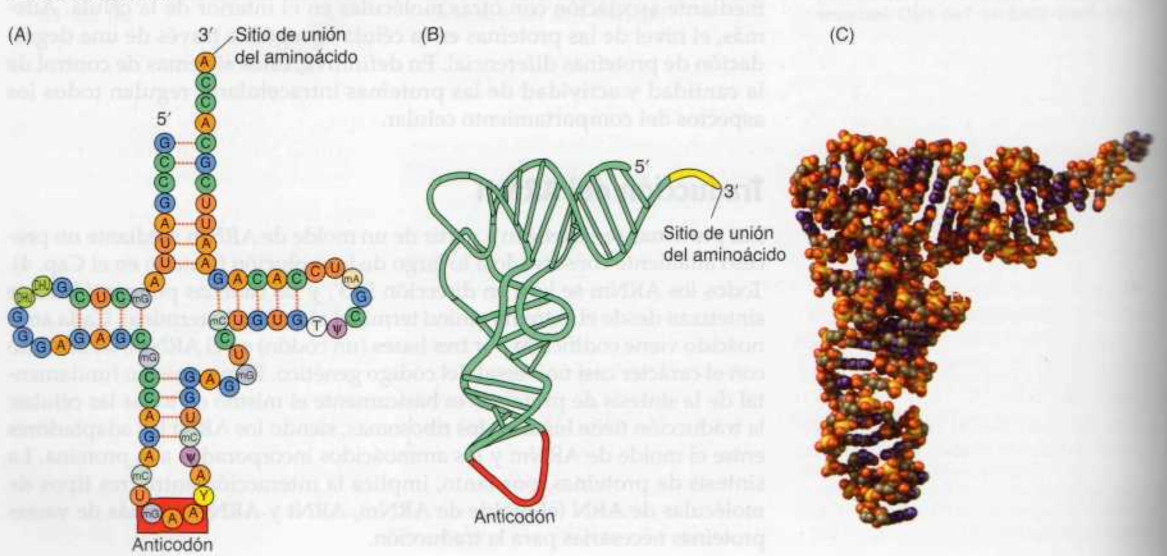
ARN de transferencia

Durante la traducción, cada uno de los 20 aminoácidos debe ser alineado con su correspondiente codón del ARNm molde. Todas las células contienen distintas moléculas de **ARN de transferencia** que sirven como adaptadores en este proceso. Como es de esperar, dada su función en la síntesis de proteínas, los distintos ARNt presentan una estructura similar. Sin embargo, también poseen secuencias únicas que permiten la unión de un aminoácido concreto con su codón en el ARNm.

Los ARN de transferencia tienen una longitud de aproximadamente 70-80 nucleótidos, con una estructura en forma de hoja de trébol que es debida a la complementariedad de bases entre distintas regiones de la molécula (Fig. 8.1). Mediante técnicas de cristalografía de rayos X se ha visto que los distintos ARNt poseen un plegamiento similar, en forma de L, que es necesario para el correcto anclaje a los ribosomas durante la traducción. Los ARNt para actuar como adaptadores necesitan dos regiones distintas y separadas en la molécula. Todos los ARNt poseen una secuencia CCA en su extremo 3' al cual los aminoácidos se unen covalentemente, en concreto a la ribosa de la adenosina terminal. La secuencia del ARNm es reconocida por el lazo **anticodón**, localizado en el otro extremo de la molécula de ARNt plegada, el cual se une al codón adecuado mediante complementariedad de bases.

La incorporación de los aminoácidos correctos en la proteína depende de la unión de cada uno de ellos a su ARNt, así como de la especificidad del apareamiento de bases entre codón y anticodón. La unión del aminoácido a su ARNt específico es mediado por un grupo de enzimas llamadas **aminoacil ARNt sintetasas**, descubiertas por Paul Zamecnik y Mahlon Hoagland en 1957. Cada una de estas enzimas reconoce un único aminoácido, y también al ARN (o ARNs) de transferencia al cual se debe unir ese aminoácido. La reacción ocurre en dos etapas (Fig. 8.2). Primero el aminoácido es activado mediante una reacción con ATP formándose un intermediario aminoacil AMP. Este aminoácido activado se une posteriormente al extremo 3' del ARNt. Las aminoacil ARNt sintetasas deben ser enzimas muy selectivas que reconozcan específicamente tanto los aminoácidos individuales como la secuencia de bases específica en los ARNt aceptores. En algunos casos la alta fidelidad del reconocimiento del aminoácido es debido en parte a una actividad correctora o «lectora de pruebas», por la cual el aminoacil AMP

Figura 8.1 Estructura de los ARNt. Se ilustra en un modelo abierto en forma de «hoja de trébol» (A) la estructura del ARNt de la fenilalanina de levadura, mostrando la complementariedad de pares de bases. Las bases nitrogenadas modificadas se indican como mG, metilguanosina; mC, metilcitosina; DHU, dihidrouridina; T, ribotimidina; Y, una purina modificada (normalmente adenosina); y ψ, seudouridina. La forma plegada de la molécula se representa en (B) y el modelo tridimensional en (C). (C, cortesía de Dan Richardson.)



incorrecto es hidrolizado antes de unirse al ARNt en la segunda etapa de la reacción. El reconocimiento del ARNt correcto por la aminoacil ARNt sintetasa también es un proceso muy selectivo: la sintetasa reconoce secuencias de nucleótidos específicas (en la mayor parte de los casos incluye el anticodón) que identifican como única a cada especie de ARNt.

Tras la unión al ARNt, el aminoácido se alinea en el ARNm molde por la complementariedad de bases entre el codón del ARNm y el anticodón del ARNt. Este reconocimiento codón-anticodón es mucho menos estricto que la complementariedad A-U y G-C explicada en capítulos anteriores. El significado de este apareamiento de bases atípico entre el codón y el anticodón está relacionado con la redundancia del código genético. De los 64 codones posibles, 3 son codones de terminación de la traducción y los otros 61 codifican para los aminoácidos (véase Tabla 4.1). Esto significa que la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón. Esta redundancia se puede explicar, en parte, por la unión de varios aminoácidos además de una especie de ARNt. *E. coli*, por ejemplo, contiene aproximadamente 40 ARNt diferentes que sirven como aceptores de los 20 aminoácidos distintos. Además, algunos ARNt son capaces de reconocer más de un codón en el ARNm, como resultado de un reconocimiento no estándar (denominado «balanceo») entre el anticodón del ARNt y la tercera posición de algunos codones complementarios (Fig. 8.3). En esta posición hay un apareamiento de bases débil debido a la formación de pares de bases G-U y a la sustitución de la guanosina por inosina en los anticodones de muchos ARNt (véase Fig. 7.44). *La inosina es una base nitrogenada que puede formar pareja con C, U o A en la tercera posición del codón, por lo cual si la inosina aparece en el anticodón permite que un único ARNt reconozca 3 codones diferentes en la secuencia del mensajero.*

Ribosoma

Los **ribosomas** son el lugar donde se sintetizan las proteínas tanto en células procariotas como eucariotas. Se caracterizaron como partículas subcelulares mediante ultracentrifugación de células lisadas y normalmente se designan de acuerdo con su coeficiente de sedimentación: 70S para los ribosomas procariotas y 80S para los ribosomas de células eucariotas, los cuales son de mayor tamaño. Tanto los ribosomas procariotas como eucariotas están formados por dos subunidades distintas, compuestas por proteínas y por **ARN ribosómicos**. El hecho de que una célula contenga muchos ribosomas refleja la importancia de la síntesis de proteínas en el metabolismo celular. *E. coli*, por ejemplo, contiene aproximadamente 20.000 ribosomas, ocupando cerca del 25% del peso seco de la célula, y las células de mamíferos en continua división contienen aproximadamente 10 millones de ribosomas.

La estructura general de los ribosomas procariotas y eucariotas es similar, aunque difieren en algunos detalles (Fig. 8.4). La subunidad pequeña del ribosoma de *E. coli* (llamada 30S) está formada por un ARNr 16S y 21 proteínas distintas; la subunidad grande (50S) está compuesta por dos ARNr, 23S y 5S, y 34 proteínas. Cada ribosómica contiene una única copia de los ARNr y una única copia de cada proteína ribosómica, con una excepción: una proteína de la subunidad 50S está presente en cuatro copias. Las subunidades de los ribosomas eucariotas son de mayor tamaño y contienen más proteínas que sus análogos procariotas. La subunidad pequeña (40S) del ribosoma eucariota está compuesta por ARNr 18S y unas 30 proteínas; la subunidad grande (60S) contiene los ARNr 28S, 5,8S y 5S además de 45 proteínas. Debido a su gran tamaño y complejidad, el análisis estructural de alta resolución de los ribosomas mediante cristalografía de rayos X no se consiguió hasta el año 2000, cuando se describieron por primera vez la estructura de las subunidades 50S y 30S. Como se describe más adelante,

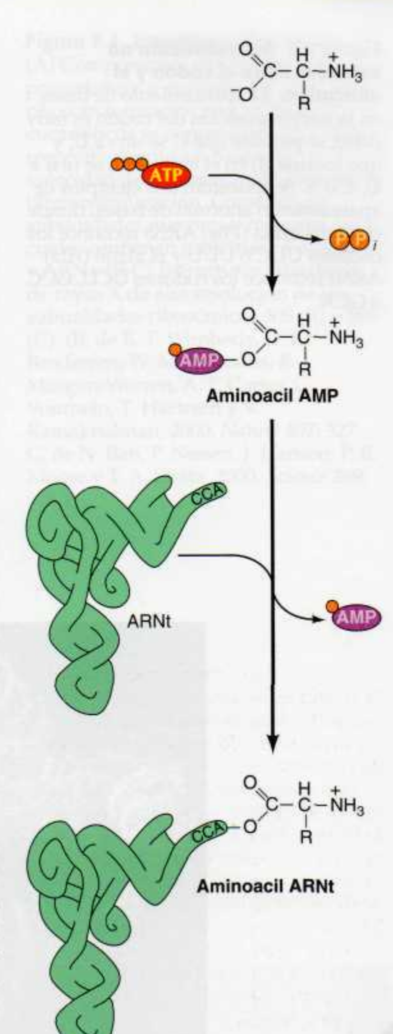
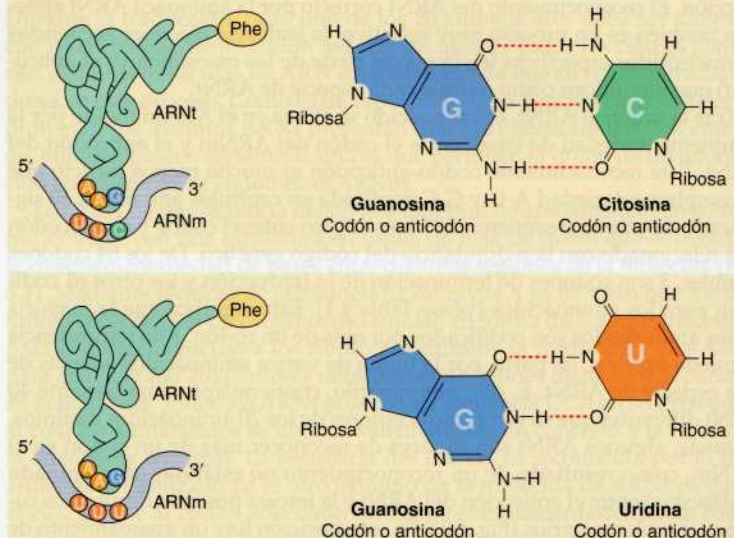
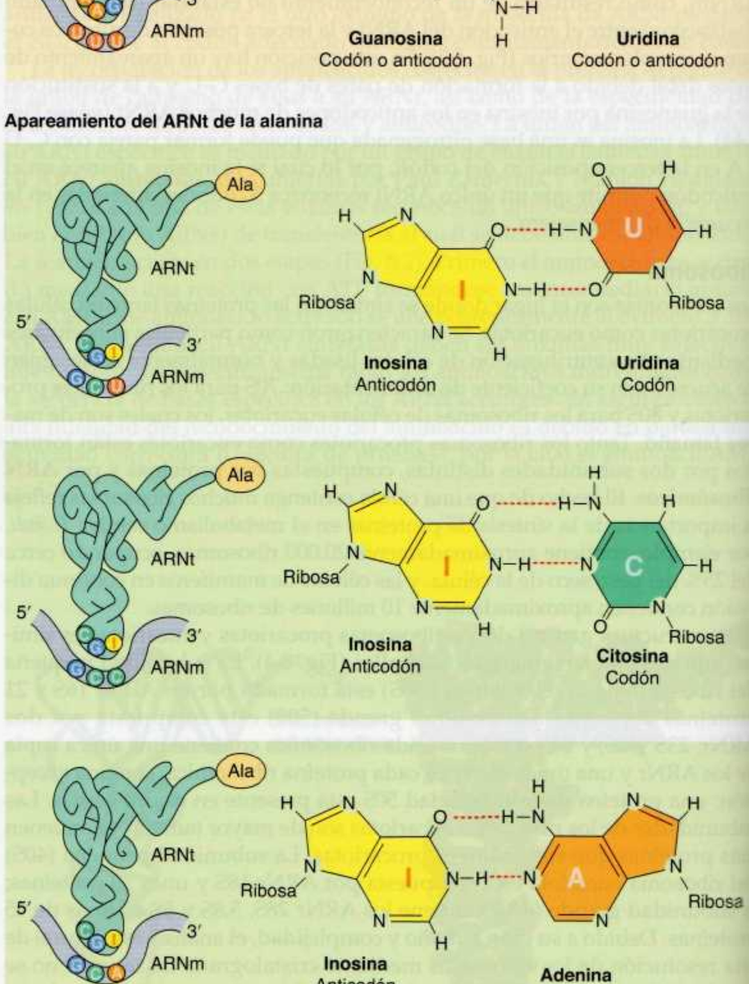


Figura 8.2 Unión del aminoácido al ARNt. En la primera reacción, el aminoácido se une al AMP y se forma un intermediario aminoacil AMP. En la segunda reacción, se produce la transferencia del aminoácido al extremo CCA 3' del ARNt aceptor, liberándose el AMP. Las dos reacciones son catalizadas por la aminoacil ARNt sintetasa.



Figura 8.3 Apareamiento no estándar entre el codón y el anticodón. El apareamiento de bases en la tercera posición del codón es muy débil; se permite que G se una a U, y que inosina (I) en el anticodón se una a U, C o A. Se muestran dos ejemplos de apareamiento anormal de bases, donde el fenilalanina (Phe) ARNt reconoce los codones UUC o UUU y el alanil (Ala) ARNt reconoce los codones GCU, GCC o GCA.





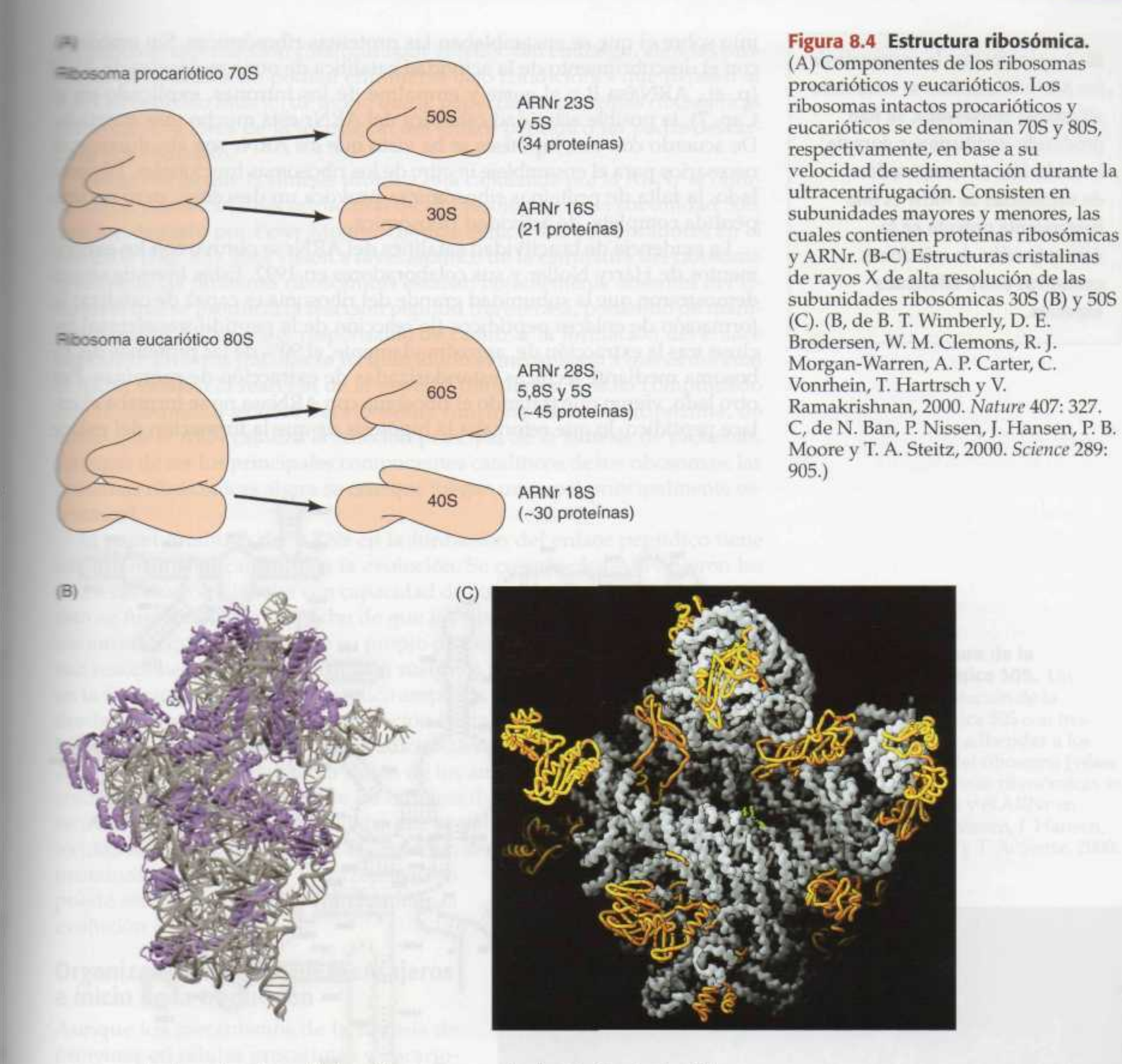


Figura 8.4 Estructura ribosómica. (A) Componentes de los ribosomas procarióticos y eucarióticos. Los ribosomas intactos procarióticos y eucarióticos se denominan 70S y 80S, respectivamente, en base a su velocidad de sedimentación durante la ultracentrifugación. Consisten en subunidades mayores y menores, las cuales contienen proteínas ribosómicas y ARNr. (B-C) Estructuras cristalinas de rayos X de alta resolución de las subunidades ribosómicas 30S (B) y 50S (C). (B, de B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartrsch y V. Ramakrishnan, 2000. *Nature* 407: 327. C, de N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore y T. A. Steitz, 2000. *Science* 289: 905.)

comprender la estructura de los ribosomas a nivel atómico ha tenido un gran impacto sobre nuestra comprensión de la función ribosómica.

Una característica importante de los ribosomas es que se pueden crear *in vitro* por autoensamblaje de sus ARNr y proteínas. Como describió Masayasu Nomura en 1968 por primera vez, las proteínas ribosómicas purificadas y los ARNr pueden mezclarse y, en condiciones adecuadas, formar un ribosoma funcional. Aunque el ensamblaje de los ribosomas *in vivo* (particularmente en las células eucariotas) es considerablemente más complejo, la capacidad de los ribosomas de auto-ensamblarse *in vitro* proporciona una valiosa herramienta experimental, permitiendo el análisis de las funciones de las proteínas y de los ARN ribosómicos.

Al igual que los ARNt, los ARNr forman estructuras secundarias características debido a la complementariedad de bases (Fig. 8.5). Los ARNr asociados a las proteínas ribosómicas se pliegan en un nivel conformacional superior formando estructuras tridimensionales. Inicialmente se pensaba que los ARNr tenían un papel exclusivamente estructural, siendo un anda-

■ A pesar de que la secuencia de los ARN ribosómicos se encuentra altamente conservada, se han producido sustituciones durante la evolución. La comparación de secuencias de ARNr es una herramienta potente en la determinación de relaciones evolutivas entre diferentes especies.

mio sobre el que se ensamblaban las proteínas ribosómicas. Sin embargo, con el descubrimiento de la actividad catalítica de otras moléculas de ARN (p. ej., ARNasa P y el corte y empalme de los intrones, explicado en el Cap. 7), la posible actividad catalítica del ARNr está mucho más aceptada. De acuerdo con esta hipótesis se ha visto que los ARNr son absolutamente necesarios para el ensamblaje *in vitro* de los ribosomas funcionales. Por otro lado, la falta de proteínas ribosómicas provoca un descenso, pero no una pérdida completa, de actividad ribosómica.

La evidencia de la actividad catalítica del ARNr se obtuvo con los experimentos de Harry Noller y sus colaboradores en 1992. Estos investigadores demostraron que la subunidad grande del ribosoma es capaz de catalizar la formación de enlaces peptídicos (la reacción de la peptidil transferasa) incluso tras la extracción de, aproximadamente, el 90% de las proteínas del ribosoma mediante técnicas estandarizadas de extracción de proteínas. Por otro lado, vieron que tratando el ribosoma con ARNasa no se formaba el enlace peptídico, lo que reforzaba la hipótesis de que la formación del enlace

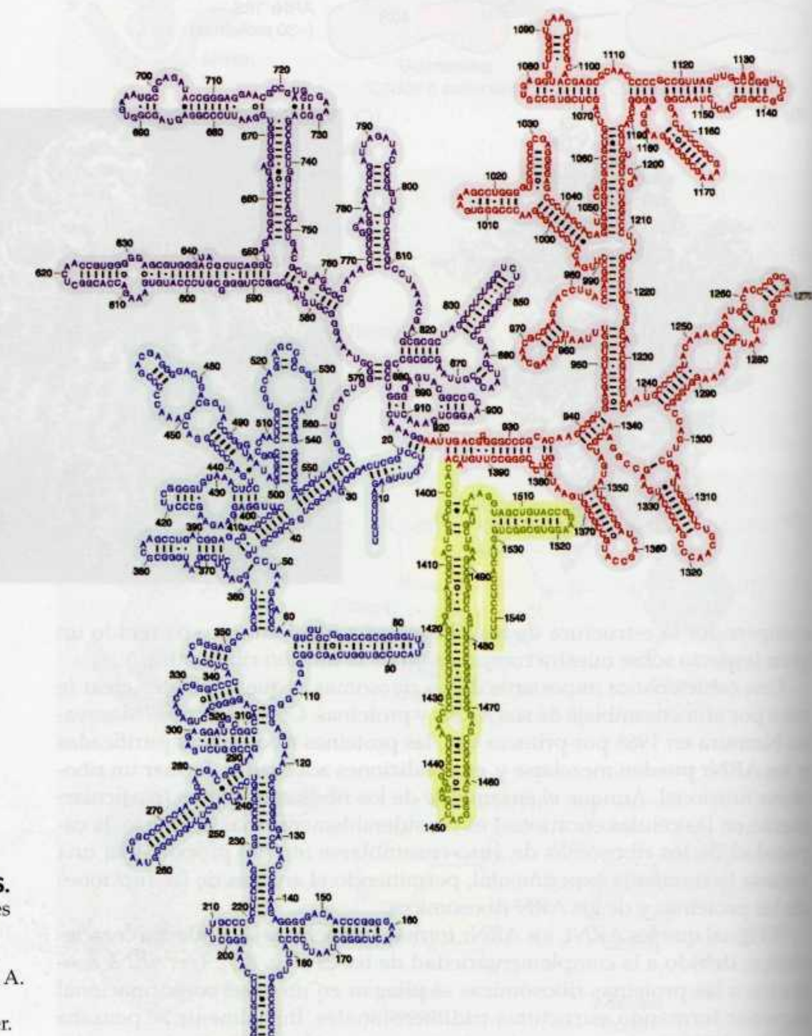


Figura 8.5 Estructura del ARNr 16S. El apareamiento de los pares de bases complementarios da lugar a una estructura secundaria característica. (De M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. H. Earnest, J. H. D. Cate and H. F. Noller. 2001. *Science* 292: 883.)

peptídico es una reacción catalizada por el ARN. Sin embargo, algunas proteínas ribosómicas no podían eliminarse bajo condiciones que dejasen al ARN ribosómico intacto, de modo que el papel de las proteínas ribosómicas como catalizadores de la formación del enlace peptídico no podía descartarse por completo.

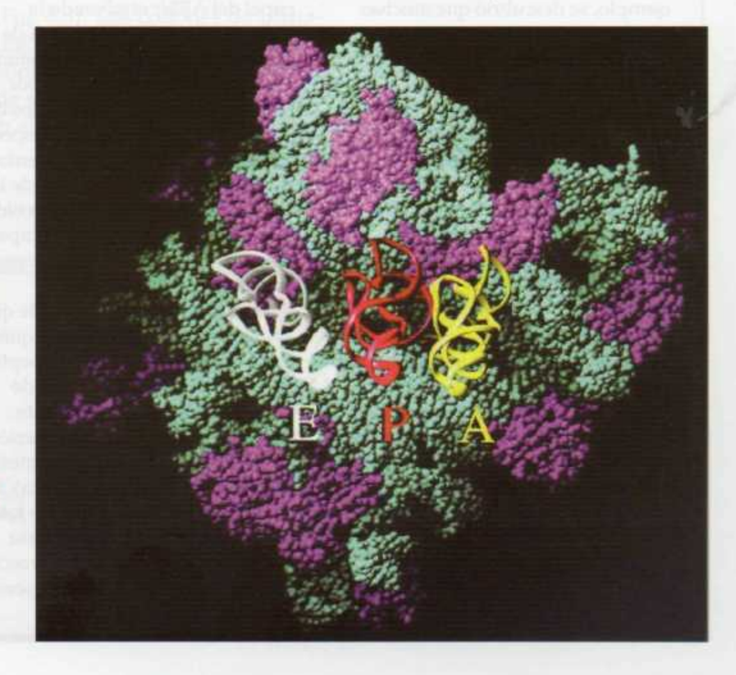
Evidencia de que la síntesis proteica está catalizada por el ARNr se obtuvo con el primer análisis estructural de alta resolución de la subunidad 50S, que fue descrito por Peter Moore, Thomas Seitz y sus colaboradores en el año 2000 (Fig. 8.6). Esta visión a nivel atómico de la estructura del ribosoma reveló que las proteínas ribosómicas estaban notablemente ausentes del sitio en el que se producía la reacción peptidil transferasa, poniendo de manifiesto que el ARNr era el responsable de catalizar la formación del enlace peptídico. En otros trabajos se ha dilucidado el mecanismo a través del cual el ARNr cataliza la reacción de la peptidil transferasa y se ha comprobado que la subunidad grande del ribosoma funciona como una ribozima, de modo que el ARN cataliza la reacción principal de la síntesis de proteínas. En lugar de ser los principales componentes catalíticos de los ribosomas, las proteínas ribosómicas ahora se cree que juegan un papel principalmente estructural.

El papel catalítico del ARNr en la formación del enlace peptídico tiene importantes implicaciones en la evolución. Se cree que los ARN fueron las primeras macromoléculas con capacidad de autorreplicación (véase Cap. 1); ésto se fundamenta en el hecho de que las ribozimas, como la ARNasa P y los intrones que participan en su propio proceso de corte y empalme, catalizan reacciones en las que participan sustratos tipo ARN. El papel del ARNr en la formación del enlace peptídico amplía la actividad catalítica del ARN, desde su capacidad de autorreplicación hasta una participación directa en la síntesis de proteínas. Estudios adicionales demuestran que el ARNr de *Tetrahymena* puede catalizar la unión de los aminoácidos al ARN, lo que da crédito a la posibilidad de que las aminoacil ARNt sintetasas primigenias estuvieran formadas por ARN y no por proteínas. La capacidad de las moléculas de ARN para catalizar las reacciones necesarias para la síntesis de proteínas además de su autorreplicación puede ser un paso clave para entender la evolución de las células.

Organización de los ARN mensajeros e inicio de la traducción

Aunque los mecanismos de la síntesis de proteínas en células procariotas y eucariotas son similares, hay algunas diferencias, en particular en las señales que determinan el sitio del ARNm molde a partir del que se debe iniciar la síntesis de una cadena polipeptídica (Fig. 8.7). La traducción no empieza simplemente en el extremo 5′ del ARNm, sino que tiene lugar en un sitio de iniciación específico. La región 5′ terminal de los ARNm de procariotas y eucariotas son secuencias no codificadoras, conocidas como regiones **5′ no codificantes (UTR)**. Los ARNm de eucariotas normalmente codifican una única cadena polipeptídica, mientras que la mayoría de los ARNm de procariotas codifican múltiples polipéptidos, sintetizados de manera inde-

Figura 8.6 Estructura de la subunidad ribosómica 50S. Un modelo de alta resolución de la subunidad ribosómica 50S con tres moléculas de ARNt adheridas a los dominios A, P y E del ribosoma (véase Fig. 8.12). Las proteínas ribosómicas se muestran en violeta y el ARNr en verde agua. (De P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore y T. A. Steitz. 2000. *Science* 289: 920.)





EXPERIMENTO CLAVE

Papel catalítico del ARN ribosómico

Resistencia anormal de la peptidil transferasa a los procedimientos de extracción de proteínas

Harry F. Noller, Vernita Hoffarth y Ludwika Zimniak
Universidad de California, Santa Cruz
Science, Volumen 256, 1992, págs. 1416-1419



Harry F. Noller

Contexto

El papel de los ribosomas en la síntesis de proteínas se descubrió en la década de los 60. Durante este período, los ribosomas se caracterizaron como partículas formadas por proteínas y ARN y también se consiguió ensamblar ribosomas funcionales a partir de sus componentes purificados. En estos años también se consideraba que la formación del enlace peptídico (reacción peptidil transferasa) era llevada a cabo por las proteínas ribosómicas mientras que los ARNr tenían una función secundaria, participando en la estructura del ribosoma. Al principio de la década de los 70, sin embargo, la evidencia empezó a sugerir que los ARNr podrían tener un papel mucho más activo en la síntesis de proteínas. Por ejemplo, se descubrió que muchas proteínas ribosómicas no tenían un papel esencial en la función del ribosoma. Por otro lado, la demostración de la existencia de algunas secuencias en el ARNr altamente conservadas en la evolución sugirió que estas moléculas de ARNr podrían tener un papel crítico.

Fue al principio de los 80, con los experimentos de Tom Cech realizados en ribozimas de *Tetrahymena* y los de Sidney Altman utilizando la ARNasa P, cuando se confirmó la actividad catalítica de las moléculas de ARN. Estos descubrimientos fueron el precedente para la hipótesis de que el ARNr está directamente implicado en la formación del enlace peptídico. Las conclusiones a las que llegaron Harry Noller y sus colaboradores, en 1992, en favor de este papel activo del ARNr se exponen en este artículo.

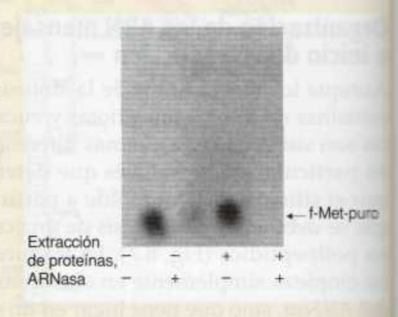
Experimentos

Para estudiar la actividad catalítica de los ARNr, Noller y sus colaboradores usaron un modelo de reacción simplificado para comprobar la actividad peptidil transferasa. Esta reacción mide la transferencia de moléculas de *N*-formilmetionina marcadas con isótopos radiactivos desde un fragmento de ARNt al grupo amino de la puromicina, un antibiótico que se asemeja a un aminoacil ARNt y puede formar enlaces peptídicos con cadenas peptídicas en crecimiento. La ventaja de este modelo de reacción peptidil transferasa es que puede llevarse a cabo por la subunidad ribosómica 50S aislada, mientras que no se requiere la presencia de la subunidad pequeña, ni de otros factores de proteínas ni de ARNm.

Los investigadores probaron el papel del ARNr ensayando la actividad peptidil transferasa de la subunidad 50S, de la cual se eliminó el componente de proteínas por procedimientos estandarizados de extracción de proteínas. Un aspecto importante de estos experimentos fue el uso de ribosomas aislados de la bacteria *Thermus aquaticus*. Debido a que este microorganismo es capaz de vivir a altas temperaturas, la estructura de su ARNr es significativamente más estable que el ARNr de *E. coli*. El resultado que se obtuvo fue que la actividad peptidil transferasa de los ribosomas de *T. aquaticus* era completamente resistente a métodos de extracción drásticos, utilizando detergentes, proteasas o fenol (véase figura). Más notable fue el mantenimiento total de la actividad peptidil transferasa incluso tras una segunda extracción que eliminó el 90% del componente de proteínas. En contraste, se vio que la peptidil transferasa era altamente sensible a tratamientos suaves con ARNasa. Aunque estos experimentos no pueden excluir un posible papel de las proteínas remanentes que no se han eliminado por los procedimientos de extracción utilizados, se constató la participación directa del ARNr 23S en la reacción peptidil transferasa.

Impacto

Los resultados de los experimentos de Noller fueron confirmados definitivamente mediante el análisis estructural de alta resolución de la subunidad ribosómica 50S descrito por Peter Moore, Thomas Steitz y sus colaboradores en el año 2000. El sitio



La reacción peptidil transferasa se ensaya mediante la formación de N-formilmetionina-puromicina radiactiva (f-Met-puro), detectada mediante electroforesis y posterior autorradiografía. Los ribosomas de *T. aquaticus* son sometidos a técnicas de extracción de proteínas o tratamiento con ARNasa, como se indica en la fotografía.

EXPERIMENTO CLAVE

ribosómico de la reacción peptidil transferasa contenía solo ARNr, sin proteínas ribosómicas en la vecindad. Estos resultados no dejaron ninguna duda de la actividad catalítica del ARN en esta reacción, demostrando que la reacción principal de la síntesis de proteínas está catalizada por el ARN ribosómico. Estos descubrimientos no sólo han tenido un notable impacto en el conocimiento de la función de los ribosomas sino que también han confirmado la ya descrita actividad catalítica de las moléculas de ARN y han proporcionado nuevos datos a la hipótesis que defiende el origen de la vida en un mundo poblado de moléculas de ARN con capacidad de autorreplicación. Esta hipótesis se basó en la capacidad de las moléculas de ARN de catalizar aquellas reacciones necesarias para su propia replicación. Este descubrimiento de la actividad catalítica del ARN en la síntesis de proteínas ha proporcionado un claro nexo entre el mundo de las moléculas de ARN y el flujo de la información genética en los organismos celulares actuales, siendo el ARNr el que lleva a cabo la reacción clave en la formación del enlace peptídico.

pendiente desde distintos sitios de iniciación. Por ejemplo, el operón *lac* de *E. coli* está formado por tres genes traducidos a partir de un único ARNm (véase Fig. 7.9). Los ARN mensajeros que codifican varios polipéptidos se llaman **policistrónicos**, mientras que son **monocistrónicos** los ARN mensajeros que codifican un único polipéptido. Finalmente, tanto los ARNm de procariotas como eucariotas terminan en **regiones 3′ no codificantes**.

Tanto en células eucariotas como procariotas, la traducción siempre comienza con el aminoácido metionina, normalmente codificado por el triplete AUG. En algunas bacterias existen codones de iniciación alternativos, como GUG, pero cuando esto ocurre al principio de una cadena polipeptídica, estos codones incorporan metionina en lugar del aminoácido que codifican normalmente (GUG generalmente codifica para valina). En la mayoría de las bacterias, la síntesis de proteínas se inicia con un residuo de metionina modificado (*N*-formilmetionina), mientras que la metionina sin modificar inicia la síntesis en eucariotas (con excepción de las mitocondrias y cloroplastos, orgánulos cuyos ribosomas tienen muchas semejanzas con los ribosomas de bacterias).

Las señales que identifican el codón de iniciación son distintas en células procariotas y eucariotas, debido a las diferencias que existen entre los ARNm policistrónicos y monocistrónicos (Fig. 8.8). Los codones de iniciación en los ARNm bacterianos son precedidos por una secuencia específica (llamada **secuencia Shine-Dalgarno**, en honor a sus descubridores John Shine y Lynn Dalgarno) complementaria de una secuencia del ARNr 16S cerca del extremo 3′, que aproxima el ARNm al ribosoma para que tenga lu-

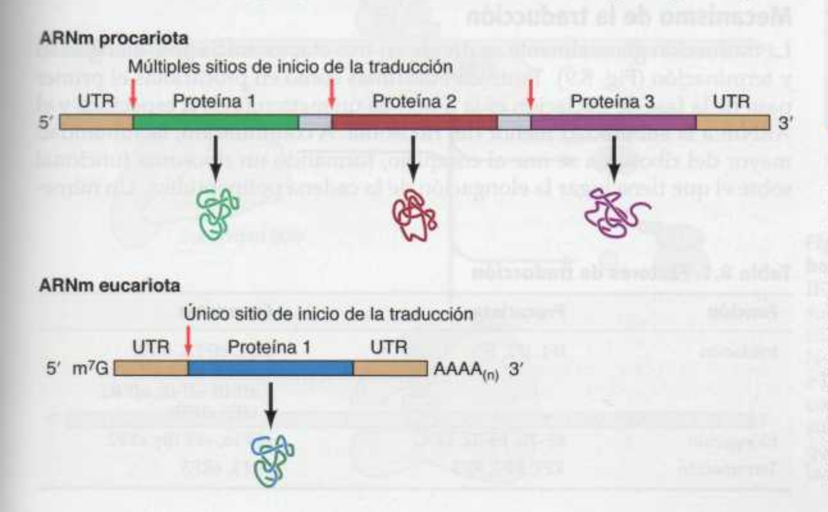


Figura 8.7 ARN mensajeros procariotas y eucariotas. Tanto los ARN procariotas como eucariotas contienen en su extremo 5′ y 3′ regiones que no se traducen (UTR). Los ARNm eucariotas también contienen una cap (caperuza) de 7-metilguanosina (m^7G) en el extremo 5′, y en el extremo 3′ la cola poli-A. Los ARNm procariotas normalmente son policistrónicos: éstos codifican múltiples proteínas, que se traducen desde sitios de iniciación independientes. Los ARNm eucariotas son, generalmente, monocistrónicos y codifican sólo una proteína.

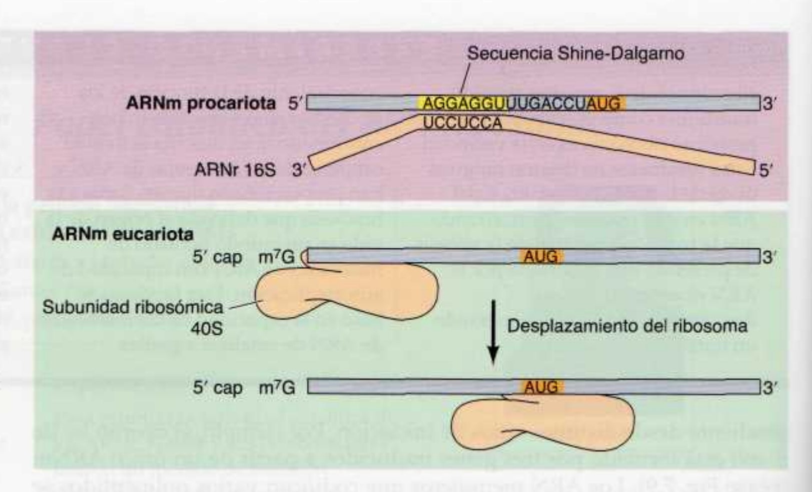


Figura 8.8 Señales de inicio de la traducción. El lugar de iniciación en los ARNm de procariotas es una secuencia llamada secuencia Shine-Dalgarno que precede al codón de iniciación AUG. La complementariedad de bases entre la secuencia Shine-Dalgarno y la secuencia del ARNr 16S cerca del extremo 3′ alinea el ARNm con el ribosoma. En las células eucariotas el ARNm se une a la subunidad 40S del ribosoma por la caperuza de 7-metilguanosina en el extremo 5′. Entonces el ribosoma se desplaza por el ARNm hasta encontrar un codón de iniciación AUG.

gar la traducción. Este apareamiento de bases complementarias permite a los ribosomas de bacterias iniciar la traducción no sólo en el extremo 5′ del ARNm, sino también en sitios de inicio dentro de los mensajeros policistrónicos. A diferencia de procariotas, en células eucariotas los ribosomas se unen al ARNm mediante el reconocimiento de la 7-metilguanosina en el extremo 5′ cap (véase Fig. 7.45). De esta forma los ribosomas se desplazan por la secuencia del mensajero hasta encontrar un codón de iniciación AUG. Las secuencias que flanquean a los tripletes AUG influyen en la eficacia de la iniciación; así en muchos casos el primer AUG en el ARNm no es reconocido y la traducción comienza en otro triplete AUG más alejado del extremo 5′. Además, debe tenerse en cuenta que varios ARNm víricos y celulares poseen sitios de entrada internos para ribosomas en los que puede iniciarse la traducción mediante la unión de un ribosoma a una posición interna del ARNm. Al parecer, este mecanismo alternativo de inicio se activa en condiciones de estrés celular para permitir la traducción selectiva de algunas moléculas de ARNm cuando se encuentra bloqueado el modo normal de inicio a partir de la caperuza 5′, como se comentará en una sección posterior de este capítulo. No se conoce el mecanismo a través del cual se inicia la traducción en estos sitios internos de entrada para ribosomas, por lo que siguen siendo objeto de activa investigación.

8.1 **Animación web**

Traducción

La traducción es la síntesis de polipéptidos dirigida por ARN.

Mecanismo de la traducción

La traducción generalmente se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación (Fig. 8.9). Tanto en eucariotas como en procariotas el primer paso de la fase de iniciación es la unión de un metionil ARNt específico y el ARNm a la subunidad menor del ribosoma. A continuación, la subunidad mayor del ribosoma se une al complejo, formando un ribosoma funcional sobre el que tiene lugar la elongación de la cadena polipeptídica. Un núme-

Tabla 8.1 Factores de traducción

Función	Procariotas	Eucariotas
Iniciación	IF1, IF2, IF3	eIF1, eIF1A, eIF2, eIF2B, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, eIF5, eIF5B
Elongación	EF-Tu, EF-Ts, EF-G	eEF1α, eEF1βγ, eEF2
Terminación	RF1, RF2, RF3	eRF1, eRF3

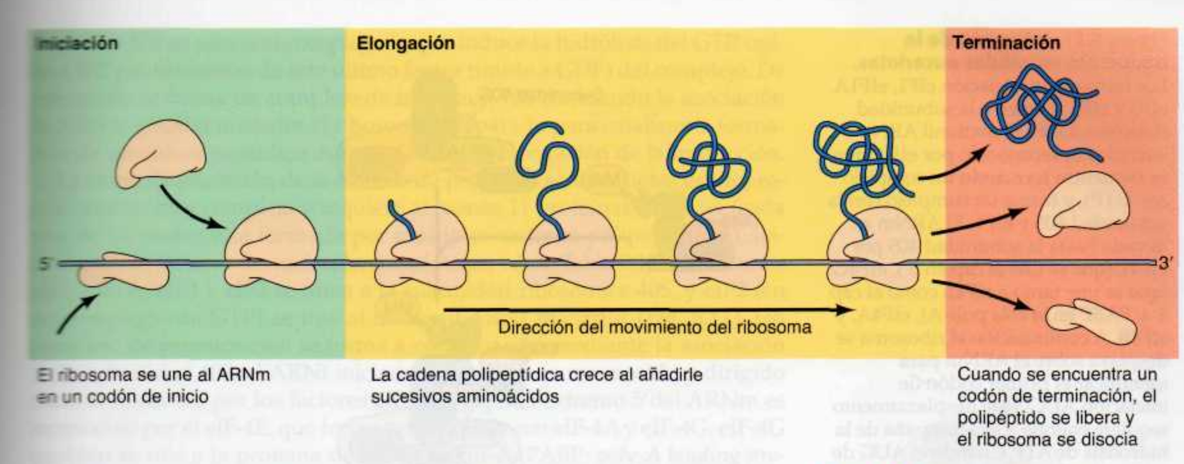


Figura 8.9 Esquema de la traducción.

ro de proteínas no ribosómicas específicas también son necesarias para diversas fases del proceso de traducción (Tabla 8.1).

En las bacterias, la traducción comienza cuando una subunidad ribosómica 30S se une a dos **factores de iniciación,** IF1 e IF3 (Fig. 8.10). El tercer factor de iniciación (IF2, que se une a GTP), el ARNm y el *N*-formilmetionil ARNt iniciador se unen después a este complejo, en el que IF2 interacciona de forma específica con el ARNt iniciador. A continuación, el ARNt se une al codón de iniciación del ARNm y se liberan IF3 e IF1. Una subunidad ri-

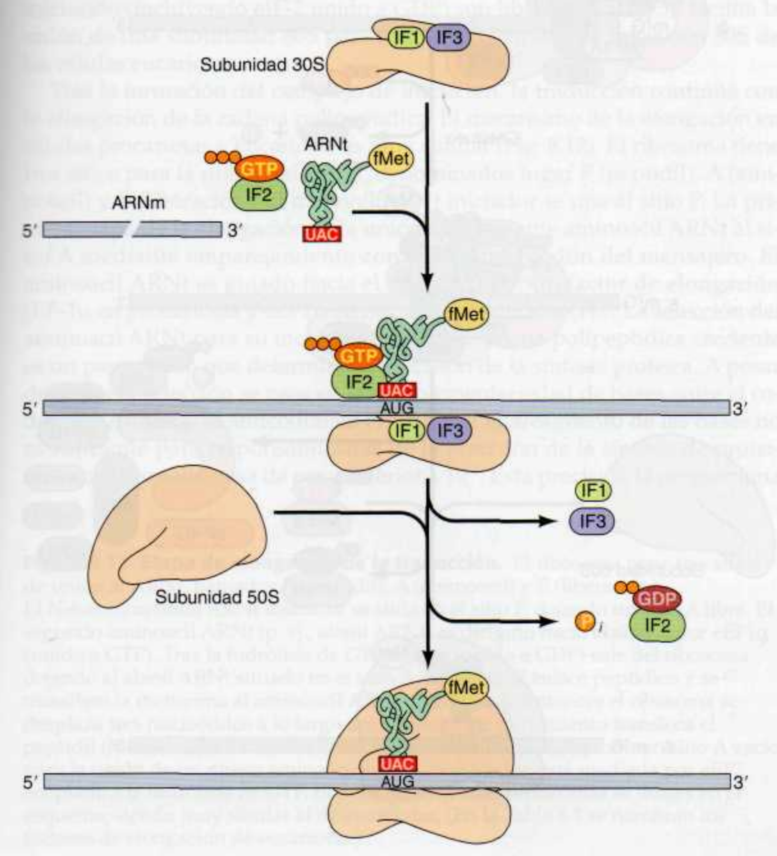


Figura 8.10 Inicio de la traducción en bacterias. Los factores de iniciación IF1 e IF3 se encuentran unidos inicialmente a la subunidad ribosómica 30S. A continuación, el ARNm, el *N*-formilmetionil (fMet) ARNt iniciador e IF2 (unido a GTP) se unen a este complejo. Se liberan IF1 e IF3 y la subunidad 50S se asocia al complejo, lo que induce la hidrólisis del GTP unido y la liberación de IF2 unida a GDP.

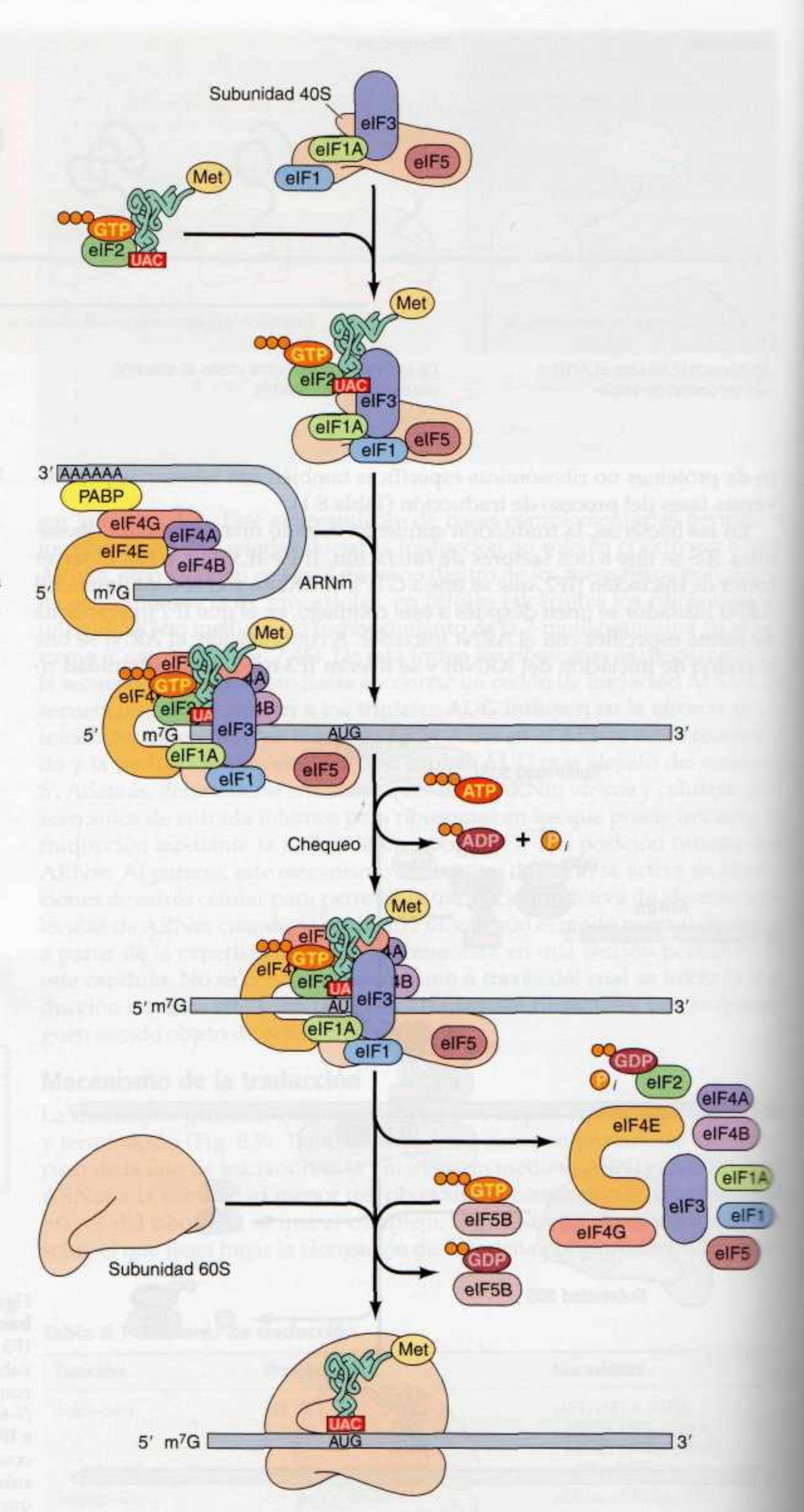


Figura 8.11 Iniciación de la traducción en células eucariotas. Los factores de iniciación eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF5 se unen a la subunidad ribosómica 40S. El metionil ARNt iniciador es reconocido por eIF2 (que se encuentra formando un complejo con GTP), y forma un complejo con la subunidad 40S y eIF1. El ARNm es llevado hasta la subunidad 40S por eIF4E (que se une al cap en 5′), eIF4G (que se une tanto a eIF4E como al cap 5′ y PABP en la cola poli-A), eIF4A, y eIF4B. A continuación el ribosoma se desplaza sobre el ARNm para identificar el primer codón de iniciación AUG. Este desplazamiento requiere energía y se acompaña de la hidrólisis de ATP. Cuando el AUG de iniciación es identificado, eIF5 desencadena la hidrólisis del GTP unido a eIF2, seguido de la liberación de eIF2 (formando un complejo con GDP) y otros factores de iniciación. A continuación, la subunidad ribosómica 60S se une al complejo 40S, gracias a la acción de eIF5B.

ribosómica 50S se asocia al complejo, lo que induce la hidrólisis del GTP unido a IF2 y la liberación de este último factor (unido a GDP) del complejo. De este modo se forma un complejo de iniciación 70S (formando la asociación de ARNm y ARNt iniciador al ribosoma) preparado para catalizar la formación de un enlace peptídico durante la fase de elongación de la traducción.

La etapa de iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotas es un proceso mucho más complejo y requiere al menos 11 proteínas distintas (cada una de las cuales está formada por múltiples cadenas polipeptídicas), llamadas eIFs (*f*actores de *i*niciación *e*ucarióticos, véase Tabla 8.1). Los factores eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF5 se unen a la subunidad ribosómica 40S, y eIF2 (en un complejo con GTP) se une al metionil ARNt iniciador (Fig. 8.11). Un complejo de preiniciación se forma a continuación mediante la asociación de la subunidad 40S, el ARNt iniciador. El ARNm es reconocido y dirigido hacia el ribosoma por los factores eIF-4. El cap del extremo 5′del ARNm es reconocido por el eIF-4E, que forma un complejo con eIF-4A y eIF-4G. eIF-4G también se une a la proteína de unión a poli-A (PABP: *poly-A binding protein*), que está asociado con la cola de poli-A en el extremo 3′ del ARNm. Por tanto los factores de iniciación eucariotas reconocen tanto el extremo 5′ como 3′ del ARNm, siendo responsables del efecto estimulador de la poliadenilación en la traducción. Los factores de iniciación eIF-4E y eIF-4G en asociación con eIF-4A y eIF-4B dirigen el ARNm hacia la subunidad ribosómica 40S, mediante interacción entre los factores eIF-4G y eIF-3. La subunidad ribosómica 40S unida al metionil ARNt y a los eIF chequea el ARNm hasta identificar un codón de iniciación AUG. Cuando el codón AUG es reconocido, eIF-5 provoca la hidrólisis del GTP unido a eIF-2. Los factores de iniciación (incluyendo eIF-2 unido a GDP) son liberados, y eIF5B facilita la unión de una subunidad 60S para formar el complejo de iniciación 80S de las células eucariotas.

Tras la formación del complejo de iniciación, la traducción continúa con la elongación de la cadena polipeptídica. El mecanismo de la elongación en células procariotas y eucariotas es muy similar (Fig. 8.12). El ribosoma tiene tres sitios para la unión del ARNt, denominados lugar P (peptidil), A (aminoacil) y E (liberación). El metionil ARNt iniciador se une al sitio P. La primera etapa de la elongación es la unión del siguiente aminoacil ARNt al sitio A mediante emparejamiento con el segundo codón del mensajero. El aminoacil ARNt es guiado hacia el ribosoma por un **factor de elongación** (EF-Tu en procariotas y eEF1α en eucariotas), unido a GTP. La selección del aminoacil ARNt para su incorporación en la cadena polipeptídica creciente es un paso crítico que determina la precisión de la síntesis proteica. A pesar de que esta selección se basa en la complementariedad de bases entre el codón del ARNm y el anticodón en el ARNt, el apareamiento de las bases no es suficiente para responsabilizarse de la precisión de la síntesis de proteínas, que posee una tasa de error inferior a 10^{-3}. Esta precisión la proporciona

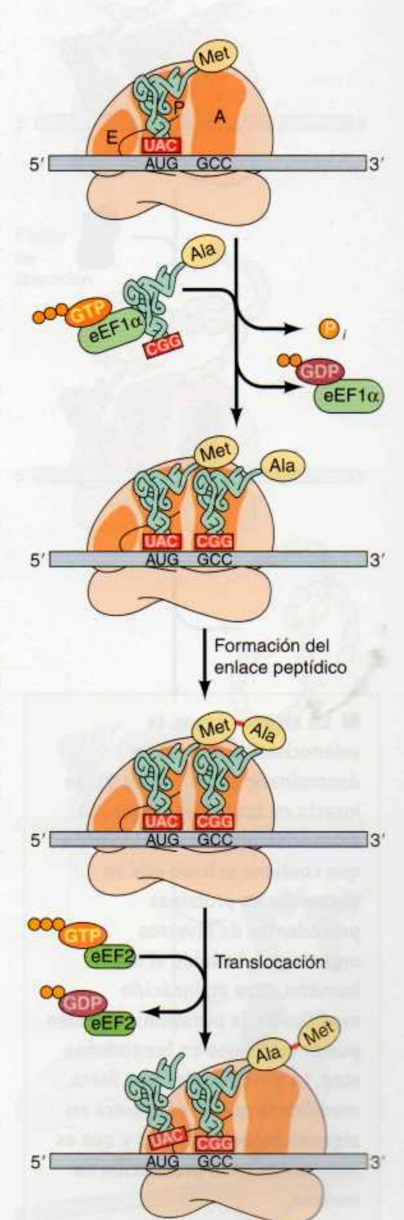


Figura 8.12 Etapa de elongación de la traducción. El ribosoma tiene tres sitios de unión al ARNt, llamados P (peptidil), A (aminoacil) y E (liberación). El *N*-formilmetionil ARNt iniciador se sitúa en el sitio P, dejando un sitio A libre. El segundo aminoacil ARNt (p. ej., alanil ARNt) es dirigido hacia el sitio A por eEF1α (unido a GTP). Tras la hidrólisis de GTP, eEF1α (unido a GDP) sale del ribosoma, dejando al alanil ARNt situado en el sitio A. Se forma el enlace peptídico y se transfiere la metionina al aminoacil ARNt en el sitio A. Entonces el ribosoma se desplaza tres nucleótidos a lo largo del ARNm. Este movimiento transloca el peptidil (Met-Ala) ARNt al sitio P y al ARNt libre al sitio E, dejando un sitio A vacío para la unión de un nuevo aminoácido. La translocación está mediada por eEF2, acoplada a la hidrólisis de GTP. El proceso en células procariotas se ilustra en el esquema, siendo muy similar al de eucariotas. (En la Tabla 8.1 se nombran los factores de elongación de eucariotas.)

un «centro descodificador» en la subunidad pequeña del ribosoma, que reconoce los pares de bases codón-anticodón correctos y discrimina los errores. La inserción de un aminoacil ARNt correcto en el dominio A da lugar a un cambio conformacional que induce la hidrólisis del GTP unido a eEF1α y la liberación del factor de elongación unido a GDP. Un resultado notable de los estudios estructurales recientes del ribosoma es que el reconocimiento del apareamiento codón-anticodón correcto en el centro descodificador, como la actividad peptidil transferasa, se basa principalmente en la actividad del ARN ribosómico en lugar de las proteínas.

Una vez que eEF1α ha salido del ribosoma, se forma un enlace peptídico entre el metionil ARNt iniciador en el sitio P y el segundo aminoacil ARNt en el sitio A. Esta reacción está catalizada por la subunidad ribosómica grande, realizando esta actividad el ARNr (como ya se ha explicado). El resultado es la transferencia de la metionina al aminoacil ARNt en el sitio A del ribosoma, formándose un peptidil ARNt en esta posición y dejando un ARNt libre en el sitio P. La etapa que sigue a la elongación es la translocación, que requiere otro factor de elongación (EF-G en procariotas y eEF-2 en eucariotas), y también está acoplada a la hidrólisis de GTP. Durante la translocación, el ribosoma se desplaza tres nucleótidos sobre el ARNm, colocándose un nuevo codón en un sito A libre. En esta etapa se transloca el peptidil ARNt desde el sitio A al sitio P, y el ARNt libre desde el sitio P al sitio E. De esta manera el ribosoma tiene un peptidil ARNt en el sitio P y un sitio A vacío. La unión de un nuevo aminoacil ARNt al sitio A induce la liberación del ARNt libre del sitio E, dejando al ribosoma preparado para la inserción de otro aminoácido a la cadena polipeptídica en crecimiento.

El proceso de elongación debe continuar, y para ello eEF1α (o EF-Tu) que es liberado del ribosoma unido a GDP, se debe convertir de nuevo en la forma unida a GTP (Fig. 8.13). Esta conversión requiere la presencia de un tercer factor de elongación, eEF1βγ (eF-Ts en procariotas), que se une a eEF-1α/GDP promoviendo la sustitución de GDP por GTP. Con este cambio se regenera un nuevo eEF1α/GTP preparado para dirigir un nuevo aminoacil ARNt al sitio A del ribosoma, comenzando un nuevo ciclo de elongación. La regulación del factor eEF1α por la unión a GTP y la hidrólisis de éste es un ejemplo de regulación de actividad de proteínas. Como se explicará en capítulos posteriores, mecanismos similares de control de la actividad ocurren en una gran variedad de proteínas que participan en la regulación del crecimiento y diferenciación celulares, así como en el transporte y secreción de proteínas.

La elongación de la cadena polipeptídica continúa hasta que un codón de terminación (UAA, UAG o UGA) se coloca en el sitio A del ribosoma. Las células no contienen ARNt con anticodones complementarios de los tripletes de terminación, pero sí tienen **factores de liberación** que los reconocen y terminan la síntesis de proteínas (Fig. 8.14). Las células procariotas cuentan con dos factores de liberación que reconocen los codones de terminación: RF1 reconoce UAA o UAG y RF-2 reconoce UAA o UGA (véase Tabla 8.1). En células eucariotas un único factor de liberación (eRF1) reconoce los tres codones de terminación. Además las células procariotas y eucariotas también tienen factores de liberación (RF3 y eRF3 respectivamente) que no reconocen codones de terminación específicos pero actúan con RF1 (o eRF1) y RF2. El factor de liberación se une a un codón de terminación en el sitio A estimulando la hidrólisis del enlace entre el ARNt y la cadena polipeptídica en el sitio P, permitiendo la salida de ésta del ribosoma. El ARNt es liberado posteriormente, disociándose las subunidades ribosómicas y la hebra de ARNm.

Los ARN mensajeros de células procariotas y eucariotas pueden ser traducidos simultáneamente por muchos ribosomas. Una vez que el ribosoma

■ **En algunos casos, la selenocisteína, que se ha denominado aminoácidos 21, se inserta en los codones stop. La selenocisteína es un aminoácido que contiene selenio que se encuentra en proteínas procedentes de diversos organismos, incluido el ser humano. Otro aminoácido modificado, la pirrolisina, también puede insertarse en los codones stop. La pirrolisina es una lisina modificada que se encuentra en algunas arqueobacterias y que es importante en la producción de metano.**

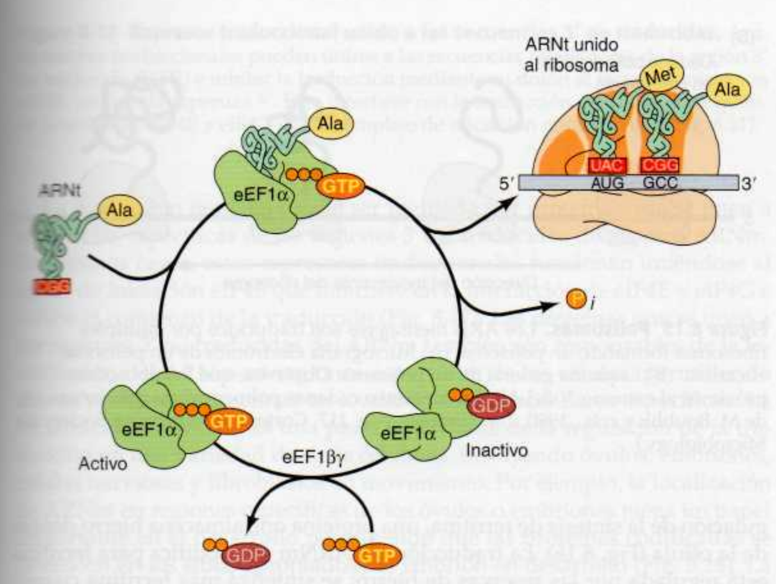


Figura 8.13 Regeneración de eEF1α/GTP. El complejo eEF1α/GTP dirige el aminoacil ARNt al ribosoma. El GTP unido es hidrolizado cuando el ARNt correcto es insertado, liberándose el complejo eEF1α/GDP, el cual es inactivo e incapaz de unir otro ARNt. Para que la translocación continúe, se debe regenerar otro eEF1α/GTP, participando en este proceso otro factor, eEF1βγ, que facilita la sustitución de GDP por un GTP libre.

se aleja de un sitio de iniciación, otro puede unirse al ARNm e iniciar la síntesis de una nueva cadena polipeptídica. Así, los ARNm son normalmente traducidos por una serie de ribosomas, separados entre ellos por aproximadamente 100-200 nucleótidos (Fig. 8.15). El conjunto de ribosomas unido a una molécula de ARNm se llama polirribosoma o **polisoma**. Cada ribosoma del polisoma funciona de manera independiente para sintetizar una cadena polipeptídica distinta.

Regulación de la traducción

Aunque la transcripción es el nivel principal de control de la expresión génica, la regulación de la traducción de moléculas de ARNm también desempeña una función destacada en la modulación de la expresión génica. La traducción de ciertas de estas moléculas puede controlarse a través de proteínas represoras de la traducción y microARN no codificantes, que constituyen unos reguladores clave de la expresión génica en los eucariotas. Adicionalmente, la actividad traduccional global de las células está modulada en respuesta al estrés celular, la disponibilidad de nutrientes y la estimulación por factores de crecimiento.

Un mecanismo de regulación traduccional es la unión de proteínas represoras, que bloquean la traducción, a secuencias específicas del ARNm. El ejemplo mejor conocido de este mecanismo en células eucariotas es la re-

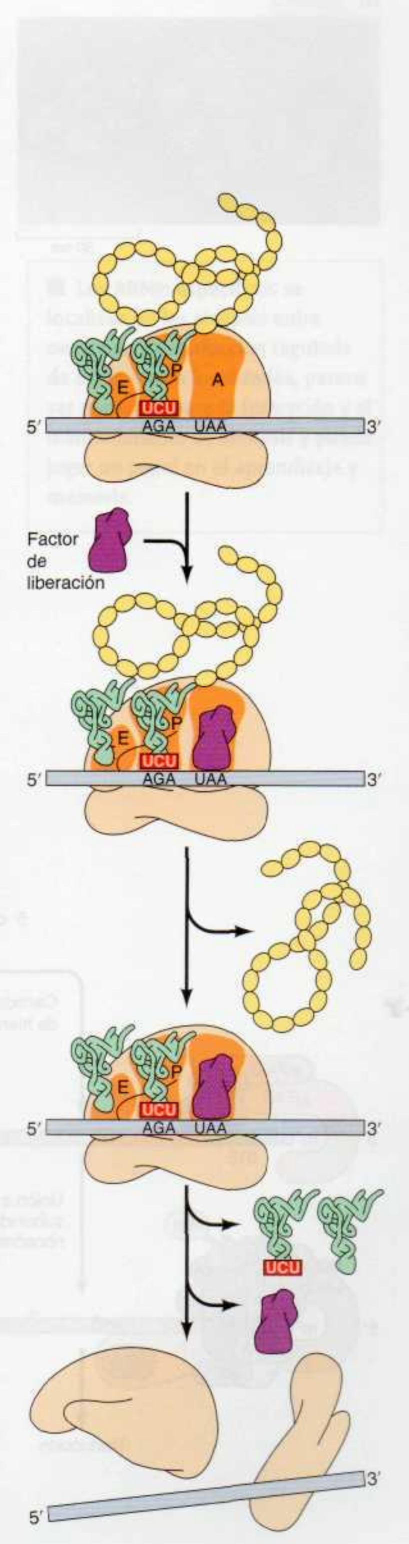
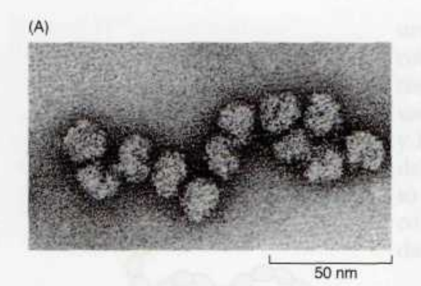


Figura 8.14 Terminación de la traducción. Un codón de terminación (p. ej., UAA) en el sitio A es reconocido por un factor de liberación en vez de por un ARNt. El resultado es la liberación de la cadena polipeptídica completa, seguido de la disociación del ARNt y ARNm del ribosoma.

(A)



(B)

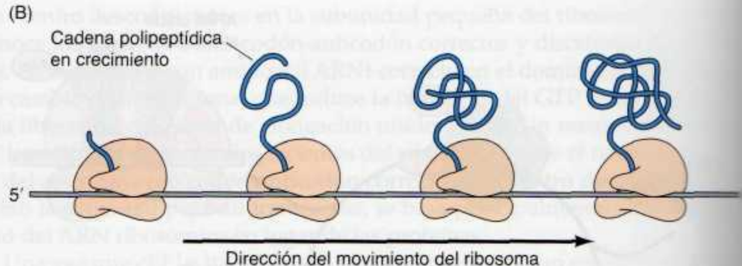


Figura 8.15 Polisomas. Los ARN mensajeros son traducidos por múltiples ribosomas formando un polisoma. (A) Micrografía electrónica de un polisoma eucariota. (B) Esquema general de un polisoma. Obsérvese que los ribosomas próximos al extremo 3′ del ARNm contienen cadenas polipeptídicas más largas. (A, de M. Boublik y cols., 1990. *The Ribosome*, pág. 117. Cortesía de American Society for Microbiology.)

gulación de la síntesis de ferritina, una proteína que almacena hierro dentro de la célula (Fig. 8.16). La traducción del ARNm que codifica para ferritina está regulada por las reservas de hierro: se sintetiza más ferritina cuanto más hierro haya. Esta regulación está mediada por proteínas reguladoras del hierro que (en ausencia de hierro) se une a una secuencia (secuencia de respuesta al hierro o IRE) en el extremo 5′ no codificante del ARNm de la ferritina, bloqueando la traducción. En presencia de hierro, la proteína reguladora del hierro no se une ya a las secuencias IRE, de modo que puede comenzar la traducción del ARNm de la ferritina. La secuencia IRE se localiza a unos 40 nucleótidos de distancia de la caperuza del extremo 5′ y se cree que las proteínas reguladoras del hierro inhibirían la traducción al interferir en la unión del ARNm a la subunidad ribosómica 40S.

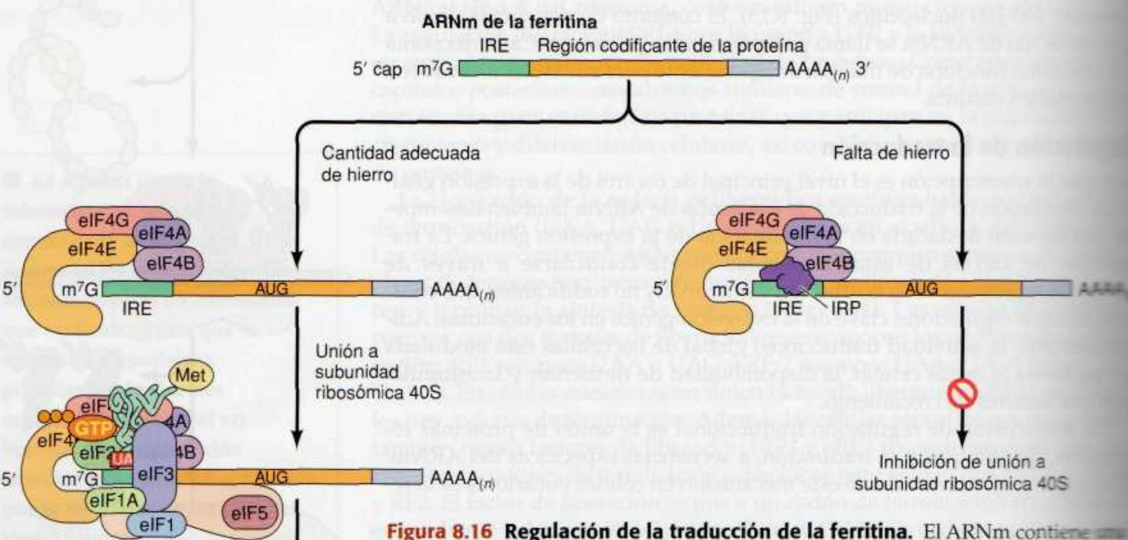
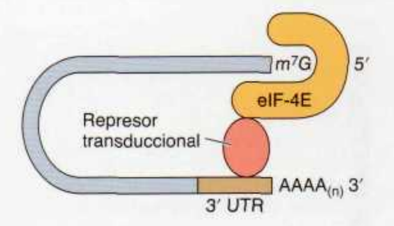


Figura 8.16 Regulación de la traducción de la ferritina. El ARNm contiene una secuencia de respuesta al hierro (IRE) cerca del cap del extremo 5′. En presencia de una cantidad adecuada de hierro, la traducción del ARNm ocurre normalmente. Sin embargo, si la cantidad de hierro disminuye, una proteína (denominada proteína de unión a la secuencia de respuesta al hierro o IRP) se une a la secuencia IRE bloqueando la traducción al interferir en la unión del ARNm a la subunidad ribosómica 40S.

Figura 8.17 Represor traduccional unido a las secuencias 3' no traducidas. Los represores traduccionales pueden unirse a las secuencias reguladoras de la región 3' no traducida (UTR) e inhibir la traducción mediante su unión al factor de iniciación eIF4E, unido a la caperuza 5'. Esto interfiere con la traducción mediante el bloqueo de la unión de eIF4E a eIF4G en un complejo de iniciación normal (véase Fig. 8.11).



La traducción también puede ser regulada por proteínas que se unen a secuencias específicas de las regiones 3' no traducidas de algunas ARNm. En algunos casos, estos represores traduccionales funcionan uniéndose al factor de iniciación eIF4E que interfiere en la interacción de eIF4E y eIF4G e inhibe el comienzo de la traducción (Fig. 8.17). Las proteínas que se unen a las regiones 3' no traducidas del ARNm también son responsables de la localización del ARNm en regiones específicas de las células, permitiendo que se produzcan proteínas en localizaciones subcelulares específicas. La localización de ARNm es una parte importante de la regulación de la traducción en una variedad de tipos celulares, incluyendo óvulos, embriones, células nerviosas y fibroblastos en movimiento. Por ejemplo, la localización de ARNm en regiones específicas de los óvulos o embriones juega un papel importante en el desarrollo permitiendo que las proteínas codificadas se sinteticen en los sitios apropiados del embrión en desarrollo (Fig. 8.18). La localización de ARNm está acoplada a la regulación de su traducción, de modo que las proteínas que codifican son sintetizadas una vez que el ARNm se encuentra adecuadamente localizado en estadio apropiado del desarrollo.

Los ARNm específicos se localizan en las sinapsis entre neuronas. La traducción regulada de estos ARNm localizados, parece ser necesaria para la formación y el mantenimiento de sinapsis y puede jugar un papel en el aprendizaje y memoria.

La regulación traduccional es especialmente importante durante el desarrollo temprano. Como se ha estudiado en el Capítulo 7, una variedad de ARNm está almacenado en los óvulos en forma no traducida; la traducción de estos ARNm almacenados es activada durante la fertilización o durante estadios posteriores del desarrollo. Un mecanismo de regulación de la traducción de este tipo está controlado por la poliadenilación de los ARNm del óvulo. Muchos ARNm son almacenados sin traducir en los óvulos con pequeñas colas de poliA (aproximadamente 30-50 nucleótidos). En un principio, estos ARNm almacenados poseen colas largas de poli-A de unos 200 nucleótidos, al igual que otros ARNm (véase Fig. 7.46). No obstante, posteriormente son reconocidos por una proteína represora de la traducción que se une a secuencias específicas de sus regiones no traducidas del extremo 3' y escinden la mayor parte de las colas de poli-A. Más adelante, estos ARNm almacenados se incorporarán a la traducción en una etapa adecuada del desarrollo a través del alargamiento de sus colas de poli-A hasta alcanzar varios cientos de nucleótidos. De este modo se permite la unión de la proteína

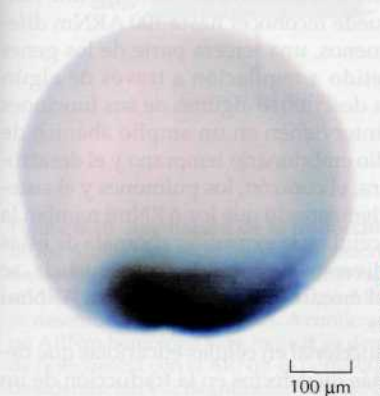


Figura 8.18 Localización del ARNm en ovocitos de *Xenopus*. Hibridación *in situ* que ilustra la localización del ARNm *Xlerk* a la corteza vegetal de los ovocitos de *Xenopus*. (Cortesía de James Deshler, Boston University.)

de unión a poli-A (PABP), la cual estimula la traducción al interaccionar con eIF4G (véase Fig. 8.11).

Uno de los adelantos más fascinantes de los que hemos sido testigo a lo largo de los últimos años ha sido el descubrimiento del papel de los ARN no codificantes en la regulación de la expresión génica. Desde su identificación en el año 1998, la **interferencia de ARN (iARN)** mediada por moléculas bicatenarias cortas de ARN se ha utilizado de manera frecuente como herramienta experimental de inhibición de la expresión génica a nivel de la traducción (véase Fig. 4.42). A pesar de que la vía de interferencia de ARN también inhibe a través de la inducción de la formación de heterocromatina (véase Fig. 7.38), actúa fundamentalmente (y, en especial, en las células animales) inhibiendo la traducción y/o induciendo la degradación de moléculas diana de ARNm. Los dos tipos principales de moléculas pequeñas de ARN que intervienen en la interferencia de ARN son los ARN de interferencia pequeños (ARNsi) y los microARN (ARNmi); ambos tipos tienen una longitud cercana a las 22 pares de bases, aunque difieren en sus orígenes. Los ARNsi se sintetizan como consecuencia de la escisión de ARN bicatenarios de mayor longitud por acción de la nucleasa Dicer (véase Fig. 4.42). Los precursores bicatenarios largos de los ARNsi pueden introducirse en las células mediante métodos experimentales o bien formarse en la propia célula a partir de transcritos solapantes. Por el contrario, la ARN polimerasa II transcribe las moléculas precursoras de los ARNmi como transcritos primarios de unos 70 nucleótidos, que a continuación se someten a reacciones de escisión secuencial catalizadas por las nucleasas Drosha y Dicer para formar moléculas bicatenarias de ARN de unos 22 nucleótidos de longitud (Fig. 18.19). Se incorporan una hebra de las moléculas de ARNmi y ARNsi al llamado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), como consecuencia de lo cual los ARNmi o ARNsi dirigen al complejo hacia ARNm complementarios. En algunos casos, las moléculas de ARNsi o ARNmi inducen la escisión del ARNm diana por acción de un componente del RISC, como se ha descrito en el Capítulo 4. Este suele ser el caso de los ARNsi o ARNmi que son secuencia complementaria perfecta de sus dianas de ARNm. No obstante, la mayoría de los ARNmi crean híbridos que no son perfectamente complementarios con sus dianas, de modo que la inhibición de la traducción medida por el complejo creado por ARNmi/RISC no se acompaña de la escisión del ARNm, si bien las moléculas no apareadas de ARNmi pueden inducir la degradación de los ARNm a través de su desadenilación (véase Fig. 7.56). No se conoce aún el mecanismo que sustenta la inhibición de la traducción por los ARNmi, aunque podría actuar tanto a nivel de la iniciación como de la elongación.

Los ARNmi desempeñan un importantísimo papel en la regulación génica. Se cree que los genomas de mamífero codifican hasta 1.000 ARNmi. Asimismo, se calcula que cada ARNmi puede reconocer hasta 100 ARNm diferentes, por lo que se supone que, al menos, una tercera parte de los genes que codifican proteínas estaría sometido a regulación a través de algún ARNmi. En la actualidad comienzan a describirse algunas de sus funciones biológicas y se ha determinado que intervienen en un amplio abanico de procesos ontogénicos, como el desarrollo embrionario temprano y el desarrollo del sistema nervioso, la musculatura, el corazón, los pulmones y el sistema inmunitario. Por otra parte, se ha demostrado que los ARNmi regulan la proliferación y la supervivencia de la célula y la expresión anómala de estas moléculas se asocia a cardiopatías y diversos tumores. En consecuencia, se están investigando de manera activa el mecanismo de acción de los ARNmi y su repertorio de funciones biológicas.

Otro mecanismo de regulación traduccional en células eucariotas que tiene un efecto global en la traducción más que efectos en la traducción de un

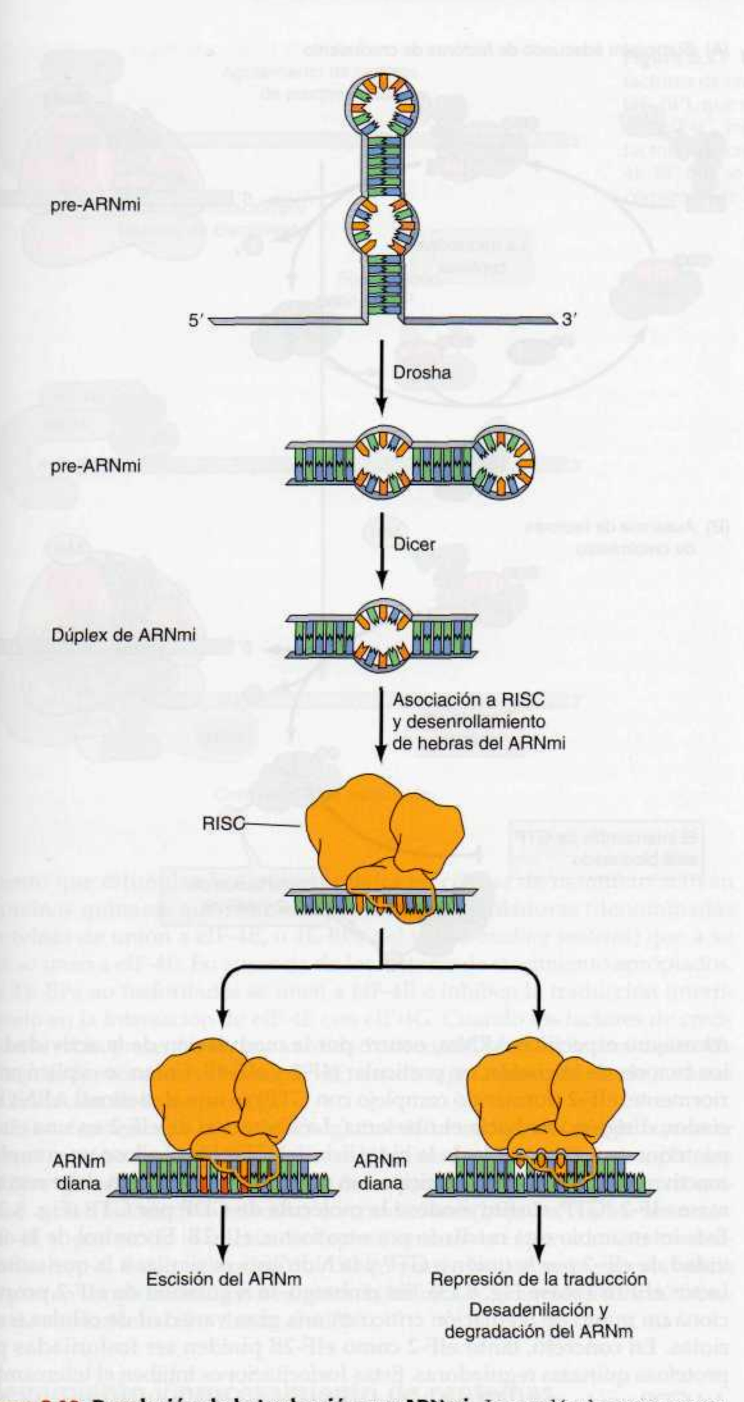


Figura 8.19 Regulación de la traducción por ARNmi. Las moléculas precursoras de los ARNmi (pre-ARNmi) sufren reacciones de escisión secuencial por acción de las nucleasas Drosha y Dicer y dan lugar a moléculas bicatenarias de ARN de unos 22 nucleótidos de longitud. Los ARNmi se asocian al complejo RISC en el que se desenrollan sus dos hebras. A continuación, los ARNmi dirigen al RISC hacia un ARNm homólogo para inducir su degradación (si la complementariedad de la secuencia con el ARNm es perfecta) o bien a la inhibición de la traducción, la desadenilación y la degradación del ARNm (si la complementariedad es imperfecta).

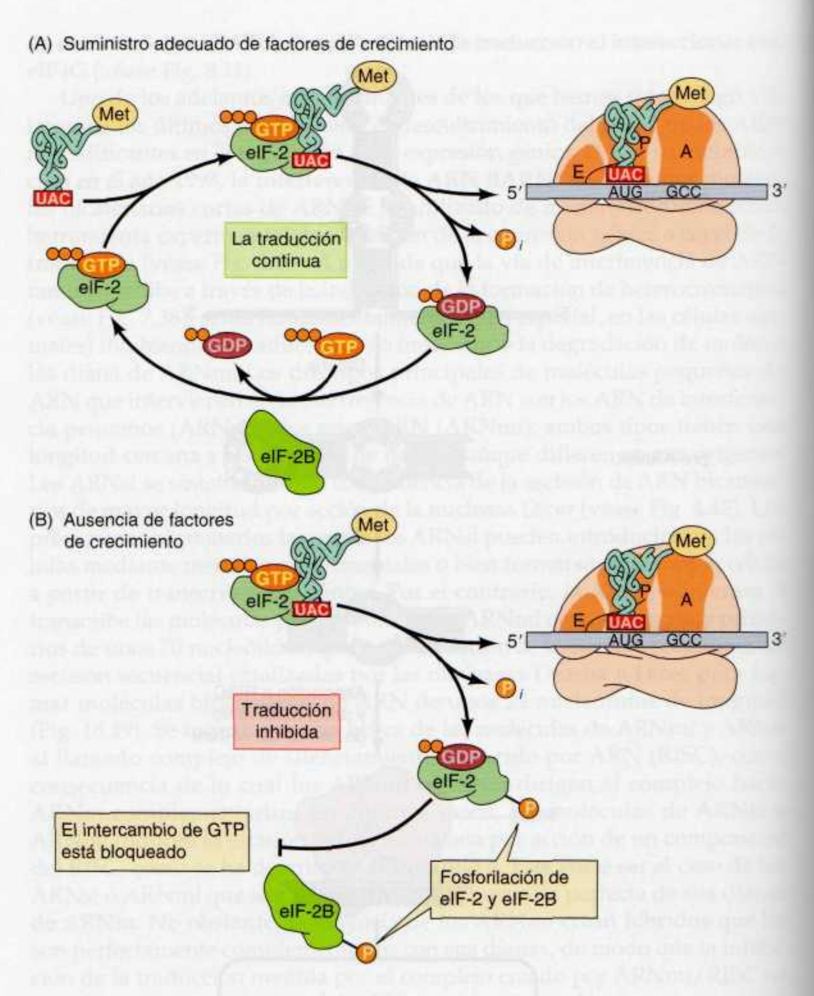


Figura 8.20 Regulación de la traducción mediante fosforilación de eIF-2 y eIF-2B. La forma activa de eIF-2 (formando un complejo con GTP) dirige el metionil ARNt iniciador al ribosoma (véase Fig. 8.11). A continuación el eIF-2 es liberado del ribosoma en su forma inactiva unida a GDP. Para continuar la traducción, eIF-2 debe ser reactivada por eIF-2B, que estimula el intercambio de GDP por GTP. La traducción puede ser inhibida (p. ej., si las células carecen de factores de crecimiento) por la acción de proteínas quinasas reguladoras que fosforilan a eIF-2 o a eIF-2B. Estas fosforilaciones bloquean el intercambio de GTP por GDP, de modo que eIF-2/GTP no puede ser regenerado.

mensajero específico ARNm, ocurre por la modulación de la actividad de los factores de iniciación, en particular eIF-2 y eIF-4E. Como se explicó anteriormente, eIF-2 (formando complejo con GTP) se une al metionil ARNt iniciador, dirigiéndolo hacia el ribosoma. La liberación de eIF-2 en una etapa posterior va acompañada de la hidrólisis del GTP, liberándose un complejo inactivo eIF-2/GDP. Para participar en otro ciclo de iniciación debe regenerarse eIF-2/GTP, sustituyéndose la molécula de GDP por GTP (Fig. 8.20). Este intercambio está mediado por otro factor, eIF-2B. El control de la actividad de eIF-2 por la unión a GTP y la hidrólisis es similar a la que sufre el factor eEF1α (véase Fig. 8.13). Sin embargo, la regulación de eIF-2 proporciona un punto de regulación crítico en una gran variedad de células eucariotas. En concreto, tanto eIF-2 como eIF-2B pueden ser fosforiladas por proteínas quinasas reguladoras. Estas fosforilaciones inhiben el intercambio del GDP unido por GTP, inhibiendo así la iniciación de la traducción. Por ejemplo, en las células de mamíferos carecientes de factores de crecimiento, se activa una proteína quinasa que fosforila a eIF-2B, inhibiendo la sucesiva síntesis de proteínas.

La regulación de la actividad de eIF-4E, que se une a la caperuza 5′ del ARNm, es otro punto crítico sobre el que actúan los factores de crecimiento para controlar la síntesis proteica (Fig. 8.21). Por ejemplo, factores de creci-

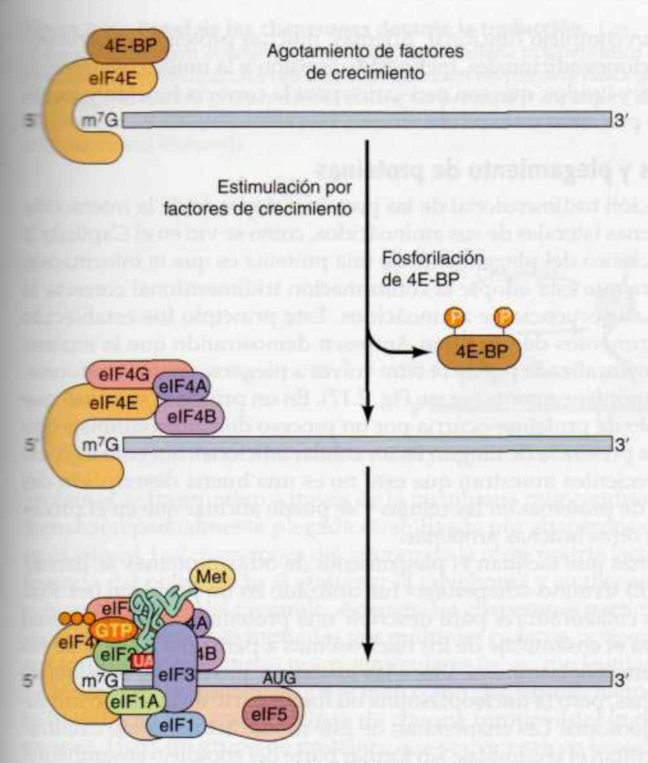


Figura 8.21 Regulación de eIF4E. En ausencia de factores de crecimiento, las proteínas de unión a eIF4E (4E-BP), que se unen a eIF4F e impiden su interacción con eIF4G, inhiben la traducción. La estimulación por factores de crecimiento induce la fosforilación de las 4E-BP, que se disocian de eIF4E y permiten el comienzo de la traducción.

miento que estimulan la síntesis proteica en células de mamífero activan proteínas quinasas que fosforilan a proteínas reguladoras (denominadas proteínas de unión a eIF-4E, o 4E-BPs del inglés *binding proteins*) que a su vez se unen a eIF-4E. En ausencia de los factores de crecimiento apropiados, las 4E-BPs no fosforiladas se unen a eIF-4E e inhiben la traducción interfiriendo en la interacción de eIF-4E con eIF-4G. Cuando los factores de crecimiento están presentes en una cantidad adecuada, la fosforilación de las 4E-BPs impide su interacción con eIF-4E, dando lugar a elevaciones de las tasas de iniciación de la traducción.

Cabe destacar que la inhibición global de la traducción puede favorecer la traducción selectiva de algunas moléculas de ARNm. Por ejemplo, los ARNm que albergan sitios internos de entrada de ribosomas pueden someterse a una traducción selectiva en condiciones bajo las cuales se inhibe eIF-4E y, por tanto, la iniciación dependiente de la caperuza. Esta traducción selectiva de un subgrupo de ARNm puede favorecer la supervivencia celular en condiciones de estrés, como la inanición, el agotamiento de factores de crecimiento o los daños al ADN.

Plegamiento y procesamiento de proteínas

La traducción completa el flujo de la información genética en la célula. En este proceso la secuencia de nucleótidos del ADN se convierte en la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica. La síntesis de un polipéptido, sin embargo, no significa que la proteína sea funcional. Para ser activos, los polipéptidos deben plegarse en conformaciones tridimensionales características y, en muchos casos, varias cadenas polipeptídicas se agregan para

dar lugar a un complejo funcional. Además, muchas proteínas experimentan modificaciones adicionales, incluyendo escisión y la unión covalente de carbohidratos y lípidos, que son necesarios para la correcta función y localización de las proteínas en la célula.

Chaperonas y plegamiento de proteínas

La conformación tridimensional de las proteínas depende de la interacción entre las cadenas laterales de sus aminoácidos, como se vio en el Capítulo 2. El principio clásico del plegamiento de una proteína es que la información necesaria para que ésta adopte la conformación tridimensional correcta la proporciona su secuencia de aminoácidos. Este principio fue establecido por los experimentos de Christian Anfinsen demostrando que la enzima ARNasa desnaturalizada puede *in vitro* volver a plegarse en una conformación activa espontáneamente (véase Fig. 2.17). En un principio se pensó que el plegamiento de proteínas ocurría por un proceso de autoensamblaje que no requería la presencia de ningún factor celular adicional. Sin embargo, estudios más recientes muestran que esto no es una buena descripción del plegamiento de proteínas en las células y se puede afirmar que en el proceso participan otras muchas proteínas.

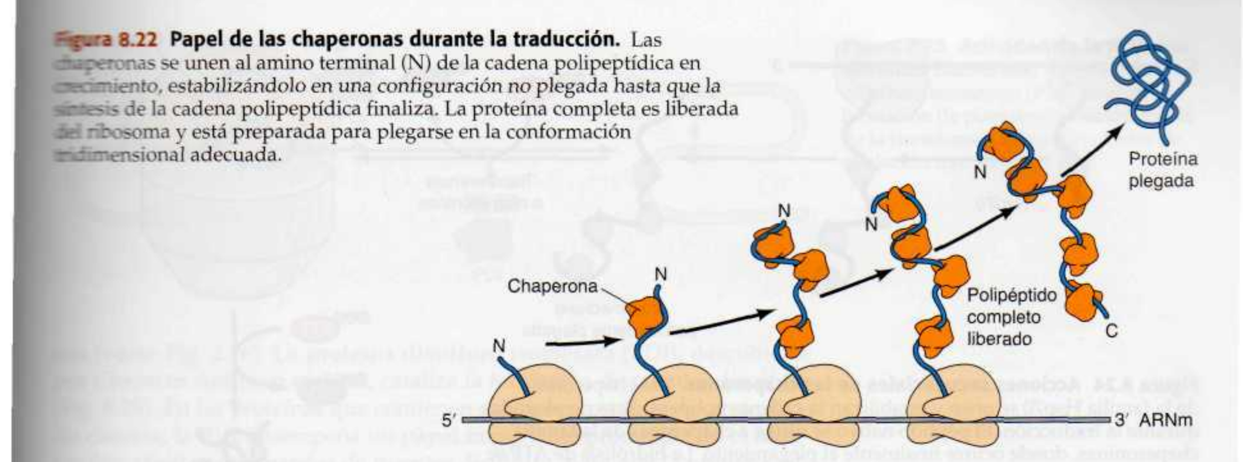
Las proteínas que facilitan el plegamiento de otras proteínas se llaman **chaperonas**. El término «chaperona» fue utilizado en un principio por Ron Laskey y sus colaboradores para describir una proteína (nucleoplasmina) necesaria para el ensamblaje de los nucleosomas a partir del ADN y de las histonas. La nucleoplasmina se une a las histonas y provoca su ensamblaje en nucleosomas, pero la nucleoplasmina no forma parte de la estructura última del nucleosoma. Las chaperonas, de este modo, actúan como catalizadores que facilitan el ensamblaje sin formar parte del complejo ensamblado. Estudios más recientes han ampliado el concepto hasta incluir proteínas que median una gran variedad de procesos de ensamblaje, particularmente el plegamiento de proteínas.

Es importante saber que las chaperonas no proporcionan una información adicional para el plegamiento de las proteínas en su conformación tridimensional; ésta viene determinada exclusivamente por la secuencia de aminoácidos. Más bien, las chaperonas catalizan el plegamiento proteico ayudando al proceso de autoensamblaje. En concreto, se cree que su función es unirse y estabilizar las cadenas polipeptídicas no plegadas o los intermediarios parcialmente plegados que se forman en la ruta que dirige al estado de plegamiento correcto. En ausencia de chaperonas, las cadenas polipeptídicas no plegadas o parcialmente plegadas son inestables en la célula y con frecuencia se pliegan de forma incorrecta o se agregan formando complejos insolubles. La unión de las chaperonas estabiliza estas formas no plegadas y por tanto previenen el plegamiento incorrecto o la formación de agregados y permiten que la cadena polipeptídica adquiera una confomación activa.

Un buen ejemplo lo proporcionan las chaperonas que se unen a las cadenas polipeptídicas nacientes a la vez que se sintetizan en los ribosomas; de este modo previenen el plegamiento incorrecto o la agregación de la porción amino terminal del polipéptido antes de que la síntesis de éste finalice (Fig. 8.22). Probablemente, este tipo de interacción 100 a 300 aminoácidos tiene importancia en las proteínas en las que el extremo carboxilo terminal (sintetizado en último lugar) es necesario para el plegamiento del extremo amino terminal. De esta manera, la chaperona unida estabiliza la porción amino terminal en una conformación extendida hasta que se sintetice el resto de la cadena polipeptídica y la proteína completa pueda plegarse correctamente. Las chaperonas también estabilizan los polipéptidos no plegados durante su transporte a los orgánulos subcelulares —por ejemplo, durante la migración de proteínas desde el citosol a la mitocondria (Fig. 8.23)—. Las

■ **El plegamiento incorrecto de las proteínas puede tener serias consecuencias para la célula. Algunas proteínas plegadas incorrectamente pueden agregarse y formar fibras insolubles, que se acumulan en los espacios extracelulares y en el interior celular. Las fibras amiloides son marcadores de diversas patologías neurodegenerativas humanas, como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson.**

Figura 8.22 Papel de las chaperonas durante la traducción. Las chaperonas se unen al amino terminal (N) de la cadena polipeptídica en crecimiento, estabilizándolo en una configuración no plegada hasta que la síntesis de la cadena polipeptídica finaliza. La proteína completa es liberada del ribosoma y está preparada para plegarse en la conformación tridimensional adecuada.



proteínas se transportan a través de la membrana mitocondrial en una conformación parcialmente plegada estabilizada por chaperonas que se unen en el citosol. Las chaperonas del interior de la mitocondria facilitan la transferencia del polipéptido al atravesar la membrana y su plegamiento posterior en el interior del orgánulo. Además, las chaperonas participan en el ensamblaje de proteínas formadas por múltiples cadenas polipeptídicas, en el ensamblaje de estructuras macromoleculares (p. ej., nucleoplasmina).

Muchas de las proteínas que actúan como chaperonas fueron inicialmente identificadas como proteínas de choque térmico (del inglés *heat-shock proteins*, Hsp), un grupo de proteínas que se expresan en las células ante determinadas circunstancias de estrés ambiental, como por ejemplo temperaturas elevadas. Existen dos familias de proteínas chaperonas, las chaperonas Hsp70 y las chaperoninas, que actúan en una vía de plegamiento proteico general tanto en células procariotas como eucariotas (Fig. 8.24). Se encuentran miembros de las familias Hsp70 y chaperoninas se encuentran

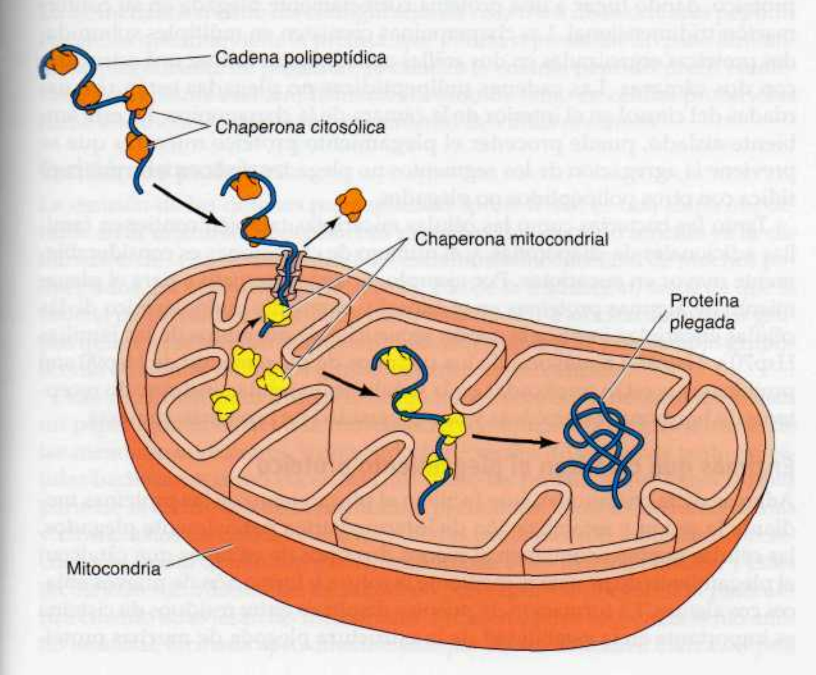


Figura 8.23 Papel de las chaperonas durante el transporte de proteínas. Un polipéptido parcialmente plegado es transportado desde el citosol a la mitocondria. Las chaperonas citosólicas estabilizan la configuración o conformación extendida. Las chaperonas mitocondriales facilitan el transporte y posterior plegamiento de la cadena polipeptídica dentro del orgánulo.

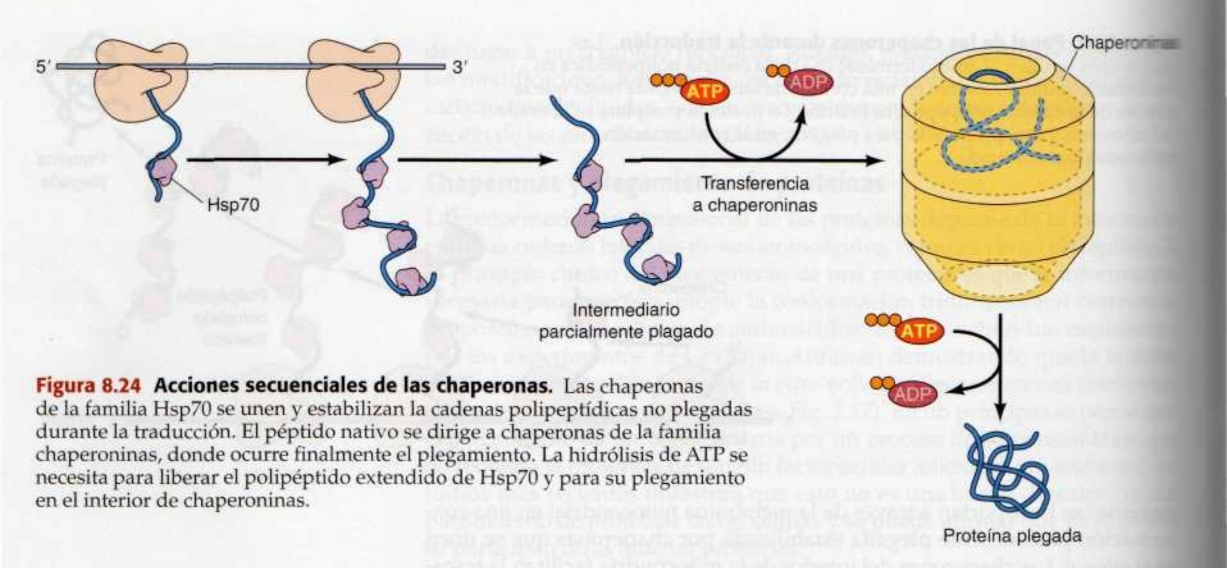


Figura 8.24 Acciones secuenciales de las chaperonas. Las chaperonas de la familia Hsp70 se unen y estabilizan la cadenas polipeptídicas no plegadas durante la traducción. El péptido nativo se dirige a chaperonas de la familia chaperoninas, donde ocurre finalmente el plegamiento. La hidrólisis de ATP se necesita para liberar el polipéptido extendido de Hsp70 y para su plegamiento en el interior de chaperoninas.

en el citosol y en los orgánulos subcelulares (retículo endoplásmico, mitocondrias y cloroplastos) de las células eucariotas, además de en bacterias. Los miembros de la familia Hsp70 estabilizan las proteínas no plegadas durante la traducción (véase Fig. 8.22) y también durante el transporte de los polipéptidos a muchos de los orgánulos subcelulares, como la mitocondria y el retículo endoplásmico. Estas proteínas se unen a pequeños fragmentos (siete u ocho residuos de aminoácidos) de los polipéptidos no plegados, manteniendo la cadena polipeptídica en una configuración o conformación extendida, impidiendo la agregación.

La cadena polipeptídica no plegada es entonces transferida de una chaperona Hsp70 a una chaperonina, en cuyo interior tiene lugar el plegamiento proteico, dando lugar a una proteína correctamente plegada en su conformación tridimensional. Las chaperoninas consisten en múltiples subunidades proteicas organizadas en dos anillas apiladas para formar una estructura con dos cámaras. Las cadenas polipeptídicas no plegadas están resguardadas del citosol en el interior de la cámara de la chaperonina. En este ambiente aislado, puede proceder el plegamiento proteico mientras que se previene la agregación de los segmentos no plegados de la cadena polipeptídica con otros polipéptidos no plegados.

Tanto las bacterias como las células eucariotas también contienen familias adicionales de chaperonas, y el número de chaperonas es considerablemente mayor en eucariotas. Por ejemplo, una vía alternativa para el plegamiento de algunas proteínas en el citosol y el retículo endoplásmico de las células eucariotas implica la acción secuencial de miembros de las familias Hsp70 y Hsp90. La mayoría de los sustratos de plegamiento de Hsp90 son proteínas que están implicadas en la señalización celular, incluyendo receptores de hormonas esteroideas y una diversidad de proteínas quinasas.

Enzimas que catalizan el plegamiento proteico

Además de la chaperonas, que facilitan el plegamiento de las proteínas mediante la unión y estabilización de intermediarios parcialmente plegados, las células también contienen al menos dos tipos de enzimas que catalizan el plegamiento de proteínas mediante la rotura y formación de nuevos enlaces covalentes. La formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína es importante en la estabilidad de la estructura plegada de muchas protei-

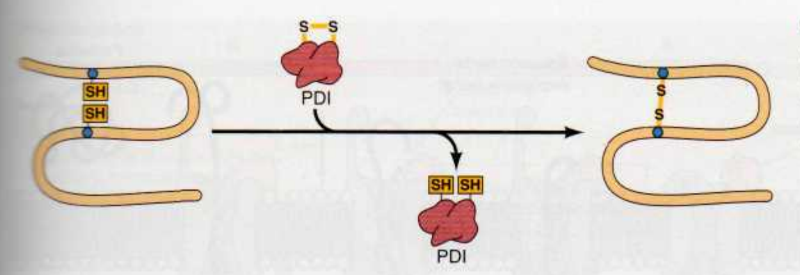


Figura 8.25 Actividad de la proteína disulfuro isomerasa. La proteína disulfuro isomerasa (PDI) cataliza la formación de puentes disulfuro a través de la transferencia de equivalentes de oxidación a su sustrato.

nas (véase Fig. 2.16). La **proteína disulfuro isomerasa** (PDI), descubierta por Christian Anfinsen en 1963, cataliza la formación de puentes disulfuro (Fig. 8.25). En las proteínas que contienen múltiples residuos del aminoácido cisteína, la PDI desempeña un papel importante promoviendo el intercambio rápido entre parejas de puentes disulfuro, para que la proteína adquiera el patrón de puentes disulfuro compatible con una conformación estable. Los puentes disulfuro son especialmente abundantes en proteínas secretadas y algunas proteínas de membrana, porque el citosol contiene agentes reductores que mantienen los residuos de cisteína en la forma reducida (—SH), impidiendo la formación del puente disulfuro (S—S). En células eucariotas, los puentes disulfuro se forman en el retículo endoplásmico, en cuyo lumen hay un ambiente oxidante. La PDI es una chaperona crítica y un catalizador del plegamiento proteico en el retículo endoplásmico y es una de las proteínas más abundantes en dicho orgánulo.

La segunda enzima con un papel importante en el plegamiento de proteínas cataliza la isomerización de los enlaces peptídicos donde participa el aminoácido prolina (Fig. 8.26). La prolina es un aminoácido especial en el que el equilibrio entre las conformaciones *cis* y *trans* del enlace peptídico que precede a un residuo de prolina está ligeramente desplazado hacia la conformación *trans*. Por el contrario los enlaces peptídicos formados entre otros aminoácidos se encuentran casi siempre en una conformación *trans*. La isomerización entre las configuraciones *cis* y *trans* de los enlaces peptídicos en los que interviene la prolina, que podría representar un paso limitante del plegamiento de proteínas, la cataliza la enzima **peptidil prolil isomerasa**. Esta enzima está ampliamente distribuida tanto en células procariotas como eucariotas y cataliza el plegamiento de varias proteínas.

Escisión de proteínas

La escisión de las cadenas polipeptídicas (**proteólisis**) es una etapa importante en la maduración de muchas proteínas. Un ejemplo sencillo es la eliminación de la metionina inicial del extremo amino terminal de muchos polipéptidos, proceso que ocurre al principio de la traducción, antes de que la cadena polipeptídica se sintetice completamente. La adición de nuevos grupos químicos al residuo amino terminal del polipéptido, por ejemplo grupos acetilo o cadenas de ácidos grasos, ocurre con frecuencia.

Las modificaciones proteolíticas de los extremos amino también tienen un papel fundamental en la translocación de muchas proteínas a través de las membranas celulares, incluyendo la secreción de proteínas tanto en células bacterianas como eucariotas, así como las proteínas que van a formar parte de la estructura de la membrana plasmática, lisosomas, mitocondrias y cloroplastos en células eucariotas. Estas proteínas son marcadas con secuencias amino terminales para transportarse a sus destinos finales, y estas secuencias son eliminadas de la cadena polipeptídica por escisión proteolítica cuando atraviesan las membranas. Por ejemplo, la **secuencia señal** amino terminal, formada aproximadamente por 20 aminoácidos, marca las pro-



Figura 8.26 Actividad de la peptidil prolil isomerasa. La peptidil prolil isomerasa cataliza la isomerización entre la conformación *cis* y *trans* de los enlaces peptídicos en los que interviene la prolina.

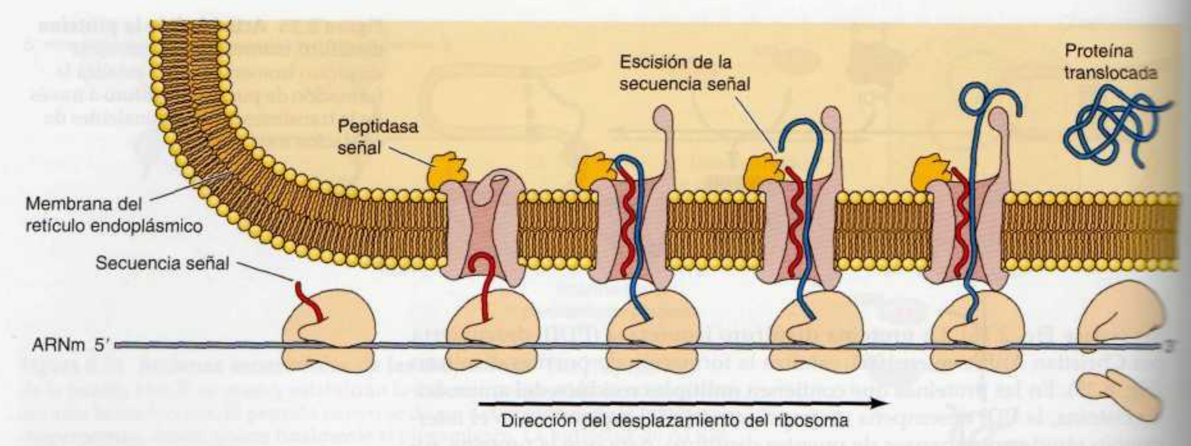


Figura 8.27 Papel de las secuencias señal en la translocación a través de la membrana. Las secuencias señal dirigen la translocación de las cadenas polipeptídicas a través de la membrana plasmática de bacterias o hacia el interior del retículo endoplásmico en las células eucariotas (véase dibujo). Esta secuencia señal, una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica se inserta en un canal de la membrana inmediatamente tras su síntesis en el ribosoma. El resto de la proteína es translocada a través del canal y la secuencia señal es eliminada por la actividad de una peptidasa señal, liberándose una proteína madura y translocada.

teínas que se dirigen a la membrana plasmática en bacterias, o al retículo endoplásmico en células eucariotas, mientras ocurre la traducción (Fig. 8.27). La secuencia señal, formada predominantemente por aminoácidos hidrofóbicos, se inserta en la membrana cuando emerge del ribosoma. El resto de la cadena polipeptídica pasa a través de un canal de la membrana a medida que es sintetizada. Esta secuencia señal posteriormente es escindida por una proteasa de membrana específica (**peptidasa señal**), liberándose la proteína madura. En células eucariotas, la translocación al retículo endoplásmico de cadenas polipeptídicas nacientes es el primer nivel en el marcaje de proteínas que se destinarán a la secreción, a formar parte de la membrana plasmática o se incorporarán a los lisosomas. Los mecanismos que dirigen el transporte de proteínas a sus destinos, así como el papel de otras secuencias señal que dirigen las proteínas al interior de las mitocondrias y cloroplastos, se discutirán en los Capítulos 10 y 11.

Otro ejemplo importante de procesamiento proteolítico es la formación de enzimas u hormonas funcionalmente activas, mediante escisión de precursores inactivos de mayor tamaño. La insulina se sintetiza como un precursor polipeptídico más grande y representa un ejemplo clásico. La insulina se forma a partir de dos escisiones. El precursor inicial (preproinsulina) contiene una secuencia señal amino terminal que dirige la cadena polipeptídica hacia el retículo endoplásmico (Fig. 8.28). La eliminación de la secuencia señal durante la translocación al retículo endoplásmico produce un segundo precursor, llamado proinsulina. Este precursor se transforma finalmente en insulina, formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, previa escisión proteolítica de un péptido interno. Otras proteínas activadas mediante mecanismos de escisión similares son las enzimas digestivas y las proteínas que participan en la coagulación sanguínea, y una cascada de proteasas que regulan la muerte celular programada en los animales.

Es interesante reseñar que las proteínas de muchos virus animales derivan de la escisión de largos precursores polipeptídicos. Un ejemplo particularmente importante del papel de la proteólisis en la replicación vírica lo proporciona el VIH. En la replicación del VIH, una proteasa codificada por el virus escinde polipéptidos precursores para formar proteínas víricas estructurales. Debido a su papel central en la replicación vírica, la proteasa del VIH (además de la transcriptasa inversa) es una importante diana para el desarrollo de drogas usadas para el tratamiento del SIDA. En efecto, los inhibidores de la proteasa son en la actualidad los fármacos más efectivos que se utilizan para combatir la enfermedad.

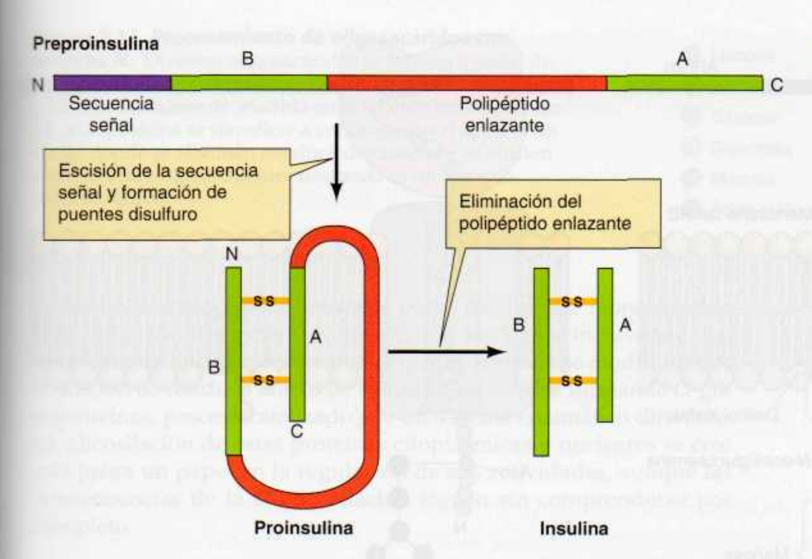


Figura 8.28 Procesamiento proteolítico de la insulina. La molécula activa de insulina consta de dos subunidades polipeptídicas (A y B) unidas por puentes disulfuro. Es sintetizada como un polipéptido precursor (preproinsulina) que contiene una secuencia señal amino terminal que se eliminará durante la transferencia de la cadena polipeptídica al retículo endoplásmico. Esta escisión origina un segundo precursor (proinsulina), que es transformado en insulina por un mecanismo de proteólisis mediante el que se elimina un fragmento interno del polipéptido.

Glicosilación

Muchas proteínas, particularmente en células eucariotas, son modificadas por la adición de carbohidratos en un proceso conocido como **glicosilación**. Las proteínas a las que se les ha añadido una cadena de glúcidos (llamadas **glicoproteínas**) normalmente son secretadas o se localizan en la superficie celular, aunque algunas proteínas nucleares o citosólicas también están glicosiladas. Los carbohidratos de las glicoproteínas tienen funciones importantes en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, en la decisión del destino de las proteínas a su compartimento intracelular, y como sitio de reconocimiento en las interacciones célula-célula.

Las glicoproteínas se clasifican en dos tipos: *N*-glicoproteínas y *O*-glicoproteínas, dependiendo del sitio de unión de la cadena de carbohidratos (Fig. 8.29). En las *N*-glicoproteínas, los carbohidratos se unen al átomo de nitrógeno de la cadena lateral del aminoácido asparragina. En las *O*-glicoproteínas, el átomo de oxígeno de los aminoácidos serina o treonina es el sitio de unión de la cadena glucídica. Los azúcares que se unen directamente a estos sitios son normalmente *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina respectivamente. Por otra parte, los residuos de manosa se pueden unir a residuos de triptófano en algunas proteínas a través de enlaces entre dos átomos de carbono.

La mayoría de las glicoproteínas de las células eucariotas será destinada a la secreción o a formar parte de la membrana plasmática. Estas proteínas se transfieren normalmente al interior del retículo endoplásmico (previa escisión de la secuencia señal) mientras la proteína es sintetizada. La glicosilación se inicia también en el retículo endoplásmico antes de que termine la traducción de la proteína. El proceso comienza con la transferencia de un oligosacárido común compuesto por 14 residuos de monosacárido (dos *N*-acetilglucosaminas, nueve manosas, y tres glucosas) a un residuo de asparragina de la cadena polipeptídica en crecimiento (Fig. 8.30). El oligosacárido se localiza en la membrana del retículo endoplásmico unido a un lípido

(Unidos a través de *N*)

Asparragina

N-acetilglucosamina unida a asparragina

(Unidos a través de *O*)

Serina

N-acetilgalactosamina unida a serina

Figura 8.29 Anclaje de carbohidratos para formar glicoproteínas. Las cadenas de azúcares de las *N*-glicoproteínas están unidas a un residuo de asparragina, mientras que los de las *O*-glicoproteínas se unen a serina (véase dibujo) o a treonina. Los azúcares unidos a los aminoácidos son, normalmente, *N*-acetilglucosamina (unidos a través de *N*) o *N*-acetilgalactosamina (unidos a través de *O*).

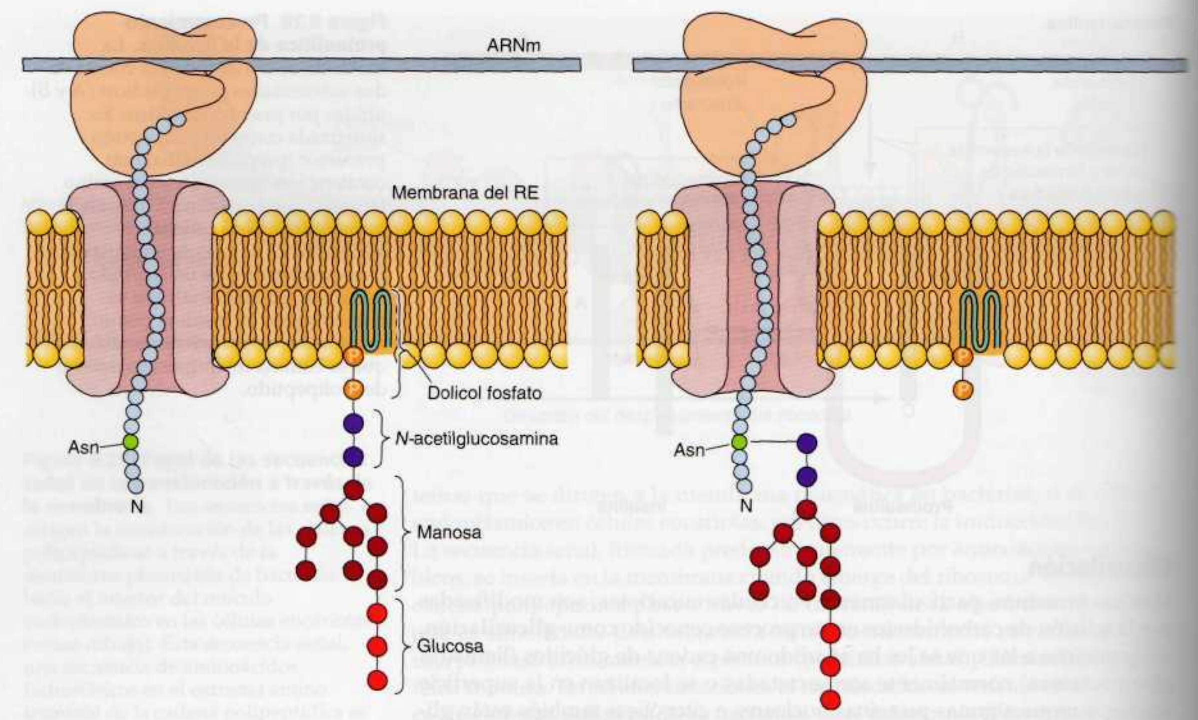


Figura 8.30 Síntesis de *N*-glicoproteínas. La primera etapa de la glicosilación es la adición, en el retículo endoplásmico (RE), de un oligosacárido formado por 14 residuos de monosacáridos a la cadena polipeptídica en crecimiento. El oligosacárido (formado por dos *N*-acetilglucosaminas, nueve manosas y tres glucosas) se une a un lípido (dolicol fosfato) en la membrana del retículo endoplásmico. El oligosacárido es transferido desde el dolicol fosfato a un residuo de asparragina de la cadena polipeptídica.

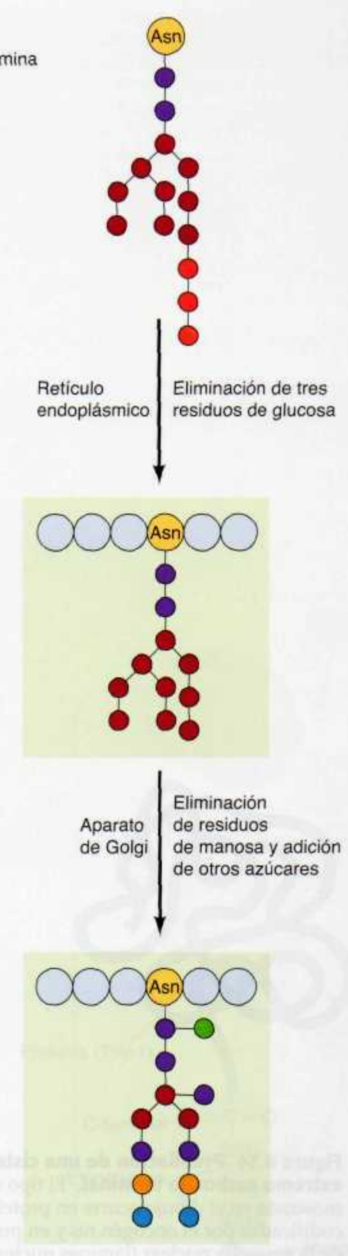
transportador (**dolicol fosfato**). Este oligosacárido es transferido como una unidad completa a un residuo de asparragina (Asn) aceptora, que forma parte de la secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido distinto de prolina).

Este oligosacárido inicial, una vez unido a la proteína, sufrirá modificaciones posteriores (Fig. 8.31). Tres residuos de glucosa y uno de manosa son eliminados mientras la proteína se encuentra en el retículo endoplásmico. Como se estudia en el Capítulo 10, estas modificaciones juegan un papel crítico en el plegamiento proteico. Posteriormente las glicoproteínas pasarán al aparato de Golgi donde sufrirán modificaciones adicionales. Estas modificaciones incluyen tanto la eliminación como la adición de distintos residuos de monosacáridos a medida que la glicoproteína es transportada por los distintos compartimentos del Golgi. Los *N*-oligosacáridos de diferentes glicoproteínas son procesados de distinta manera dependiendo de las enzimas presentes en los distintos tipos celulares y de la accesibilidad del oligosacárido a las enzimas que catalizan su modificación. A las glicoproteínas con oligosacáridos inaccesibles no se les añade nuevos monosacáridos en el Golgi. Por el contrario, las glicoproteínas cuyos oligosacáridos son más accesibles a las enzimas son modificadas en mayor grado, originando una gran variedad de oligosacáridos complejos.

Los *O*-oligosacáridos se añaden a las proteínas en el aparato de Golgi. A diferencia de los ligados a *N*, los *O*-oligosacáridos se forman por la adición

Figura 8.31 Procesamiento de oligosacáridos con enlaces *N*. Diversos oligosacáridos se forman a partir de modificaciones posteriores de la unidad común de 14 azúcares inicialmente añadida en el retículo endoplásmico. La glicoproteína se transfiere a continuación al aparato de Golgi donde se eliminan residuos de manosa y se añaden otros azúcares. La estructura mostrada es un ejemplo representativo.





de un único azúcar compuesto por pocos residuos de monosacárido (Fig. 8.32). Muchas proteínas citosólicas y nucleares, incluyendo una gran variedad de factores de transcripción, también se modifican por la adición de residuos únicos de *N*-acetilglucosamina formando *O*-glicoproteínas, proceso catalizado por un sistema enzimático diferente. La glicosilación de estas proteínas citoplásmicas y nucleares se cree que juega un papel en la regulación de sus actividades, aunque las consecuencias de la *O*-glicosilación siguen sin comprenderse por completo.

Anclaje de lípidos

Algunas proteínas en las células eucariotas se modifican mediante el anclaje de moléculas lipídicas a la cadena polipeptídica. Estas modificaciones con frecuencia marcan y anclan estas proteínas a la membrana plasmática, siendo el lípido por su naturaleza hidrofóbica el que se inserta en la membrana (véase Fig. 2.25). En las proteínas ancladas a la cara citosólica de la membrana de las células eucariotas son comunes tres tipos de modificaciones por adición de lípidos —*N*-miristoilación, prenilación y palmitoilación—. Un cuarto tipo de modificación, la adición de glicolípidos, tiene un papel importante en el anclaje de algunas proteínas a la cara extracelular de la membrana plasmática.

En algunas proteínas, un ácido graso se une al extremo amino terminal de la cadena en crecimiento durante la traducción. En este proceso, llamado **N-miristoilación**, el ácido mirístico (un ácido graso de 14 átomos de carbono) se une a un residuo N-terminal de glicina (Fig. 8.33). La glicina es con frecuencia el segundo aminoácido incorporado a la cadena polipeptídica durante la traducción; el residuo iniciador de metionina es eliminado por proteólisis antes de la adición del áci-

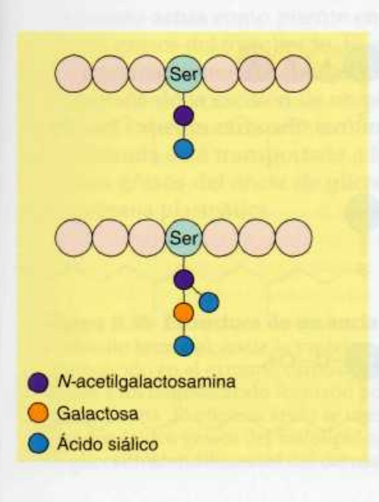
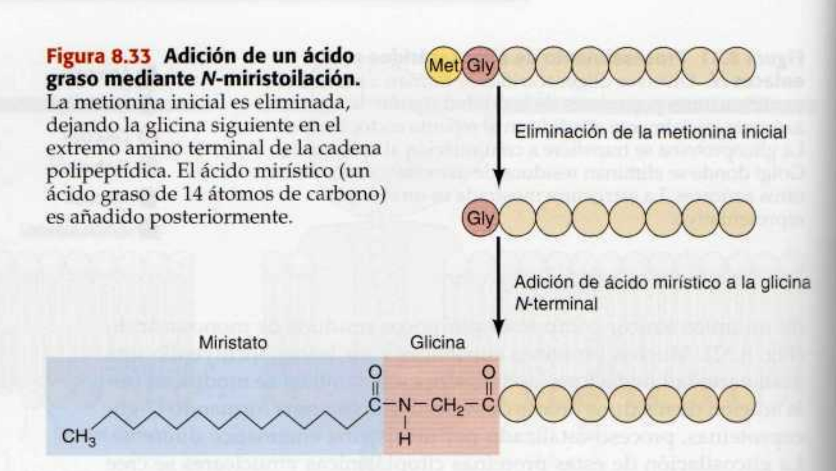


Figura 8.32 Ejemplos de *O*-oligosacáridos. Los oligosacáridos ligados a *O* normalmente están formados por pocos residuos de monosacárido, que se añaden uno a uno.

Figura 8.33 Adición de un ácido graso mediante *N*-miristoilación. La metionina inicial es eliminada, dejando la glicina siguiente en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica. El ácido mirístico (un ácido graso de 14 átomos de carbono) es añadido posteriormente.



do graso. Muchas proteínas que son modificadas por *N*-miristoilación están asociadas a la cara interna de la membrana plasmática; el papel del ácido graso en esta asociación se conoce a partir de experimentos que utilizan proteínas mutadas en las que la glicina N-terminal es sustituida por alanina. Esta sustitución impide la unión del ácido mirístico y bloquea la función de la proteína mutada impidiendo su anclaje a la membrana.

Los lípidos también se pueden anclar a las cadenas laterales de los aminoácidos cisteína, serina y treonina. Un ejemplo importante de este tipo de modificación es la **prenilación**, en la que un tipo específico de lípidos (grupos prenilo) se anclan a átomos de azufre de las cadenas laterales de los residuos de cisteína localizados cerca del extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica (Fig. 8.34). Muchas proteínas asociadas a la membrana plasmática que participan en el control del crecimiento y diferenciación celulares son modificadas por esta vía, incluyendo la proteínas del oncogén *ras*, que son responsables del crecimiento celular incontrolado de muchos tumores humanos (véase Cap. 18). La prenilación de estas proteínas ocurre

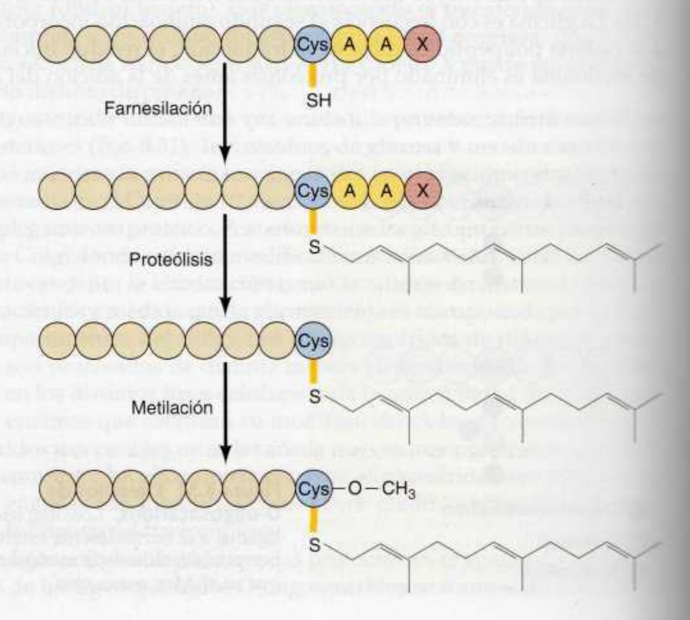


Figura 8.34 Prenilación de una cisteína en el extremo carboxilo terminal. El tipo de prenilación mostrada en el dibujo ocurre en proteínas codificadas por el oncogén *ras* y en proteínas de la envuelta nuclear (láminas nucleares). Estas proteínas terminan en un residuo de cisteína seguida de dos aminoácidos alifáticos (A) y otro aminoácido designado con la letra X, en el extremo carboxilo terminal. La primera etapa de la modificación es la adición de un grupo farnesilo, compuesto por 15 átomos de carbono, a la cadena lateral de la cisteína (farnesilación). En segundo lugar, ocurre la eliminación proteolítica de los tres aminoácidos que siguen a la cisteína, y, finalmente, la metilación de ésta que ahora se encuentra en el extremo carboxilo terminal.

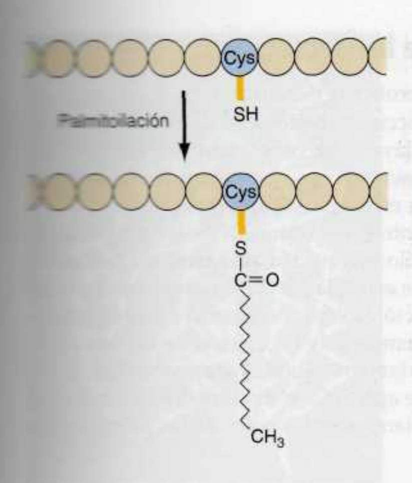


Figura 8.35 Palmitoilación. El palmitato (un ácido graso de 16 átomos de carbono) es añadido a la cadena lateral de un residuo interno de cisteína.

en tres etapas. Primero, el grupo prenilo se añade a una cisteína localizada a una distancia de tres aminoácios del extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica. Los grupos prenilo añadidos en esta reacción pueden ser el farnesilo (15 carbonos, como se muestra en la Fig. 8.34) o geranilgeranilo (20 carbonos). Los aminoácidos siguientes a la cisteína modificada son eliminados, dejando la cisteína en el extremo carboxilo terminal. Finalmente, un grupo metilo se añade al grupo carboxilo de la cisteína terminal.

El tercer tipo de modificación por adición de ácidos grasos es la **palmitoilación**, en la que el ácido palmítico (un ácido graso de 16 átomos de carbono) se une a los átomos de azufre de la cadena lateral de residuos internos de cisteína (Fig. 8.35). Como la *N*-miristoilación y la prenilación, la palmitoilación tiene un papel importante en el anclaje de algunas proteínas a la cara citosólica de la membrana plasmática.

Finalmente, los lípidos unidos a oligosacáridos (**glicolípidos**) se añaden a los grupos carboxilo terminal de algunas proteínas, sirviendo como anclaje de estas proteínas a la superficie externa de la membrana plasmática. Debido a que los glicolípidos unidos a estas proteínas contienen fosfatidilinositol, normalmente se llaman **«anclas» de glicosilfosfatidilinositol,** o **GPI**, (Fig. 8.36). Las porciones oligosacáridas del glicosilfosfatidilinositol se unen al grupo carboxilo terminal de las cadenas polipeptídicas. El grupo inositol del fosfatidilinositol se une a su vez al oligosacárido, por tanto el grupo carbohidrato actúa como puente entre la parte de proteínas y las cadenas de ácidos grasos del fosfolípido. El glicosilfosfatidilinositol se sintetiza y une a las proteínas como una unidad en el retículo endoplásmico. Esta adición se acompaña de la escisión de un péptido de aproximadamente 20 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica. La proteína modificada será transportada a la superficie celular, donde las cadenas de ácidos grasos del ancla de glicosilfosfatidilinositol median su unión a la membrana plasmática.

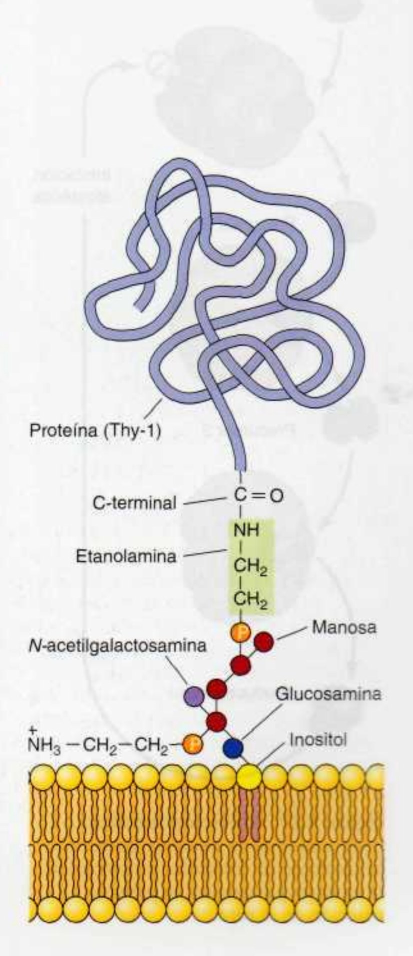


Figura 8.36 Estructura de un ancla GPI. El glicosilfosfatidilinositol, unido al carboxilo terminal, ancla la proteína a la membrana plasmática. Éste se une al aminoácido en el extremo carboxilo terminal a través de una etanolamina, que está unida a un oligosacárido formado por residuos de manosa, *N*-acetilgalactosamina y glucosamina. El oligosacárido se une a su vez al grupo inositol del fosfatidilinositol. Los dos ácidos grasos del fosfolípido se insertan dentro de la membrana plasmática. El glicosilfosfatidilinositol del dibujo pertenece a la proteína Thy-1 de una rata.

Regulación de la función de las proteínas

Una función importante de muchas proteínas es actuar como enzimas, necesarias para catalizar casi todas las reacciones biológicas. La regulación de la actividad enzimática tiene un papel clave en el comportamiento celular. Esto se logra, en parte, a nivel de la expresión génica, que determina la cantidad de una enzima (proteína) sintetizada en la célula. Un nivel posterior de regulación se consigue mediante el control de la función de las proteínas, lo cual permite a la célula regular no sólo la cantidad sino también la función de sus proteínas. La regulación de las actividades de algunas proteínas implicadas en la transcripción y traducción ya se ha expuesto en este capítulo y en el precedente, y muchos más ejemplos de regulación de la función de las proteínas en el control del comportamiento celular se expondrán a lo largo del desarrollo de este libro. En este apartado se discuten los tres mecanismos generales por los cuales se regulan las actividades de las proteínas celulares.

Regulación por pequeñas moléculas

La mayoría de las enzimas son reguladas por cambios en su conformación que provocan modificaciones en su actividad catalítica. En muchos casos estos cambios de conformación se producen por la unión de pequeñas moléculas, como aminoácidos o nucleótidos, que regulan la actividad enzimática. Este tipo de regulación es normalmente responsable del control de vías metabólicas en las que hay mecanismos de inhibición *feedback* (retroinhibición). Por ejemplo, los productos finales de muchas rutas enzimáticas (p. ej., aminoácidos) inhiben la enzima que cataliza la primera etapa de su síntesis; de esta manera se asegura una cantidad adecuada de producto y a su vez se evita su producción en exceso (Fig. 8.37). La retroinhibición es un ejemplo de **regulación alostérica** en la que una molécula reguladora se une a un sitio de la enzima distinto del centro activo (*alo* = otro; *estérico* = sitio). La unión de esta molécula reguladora modifica la conformación de la proteína, con lo cual se produce un cambio en su centro activo, afectando a la actividad enzimática (véase Fig. 3.8). Muchos factores de transcripción (vistos en el Cap. 7) también están regulados por la unión de pequeñas moléculas. Por ejemplo, la unión de lactosa al represor *E. coli lac* induce un cambio conformacional que impide que el represor se adhiera al ADN (véase Fig. 7.8). En las células eucarióticas, las hormonas esteroideas controlan de forma similar la expresión génica uniéndose a proteínas reguladoras de la transcripción.

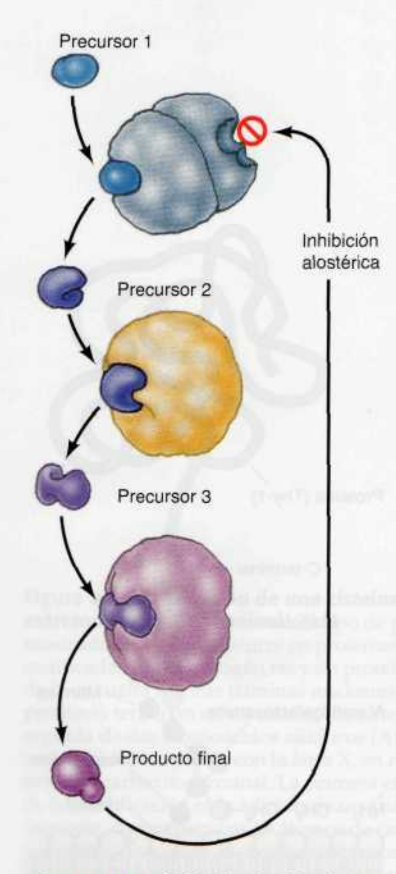


Figura 8.37 Inhibición *feedback*. El producto final de una ruta bioquímica actúa como un inhibidor alostérico de la enzima que cataliza la primera reacción de la ruta.

La regulación de los factores de traducción como eEF-1α por la unión del GTP (véase Fig. 8.13) es un ejemplo de otro mecanismo común de regulación de la actividad de proteínas intracelulares. En este caso, la forma unida a GTP es la conformación activa, mientras que en la unida a GDP la proteína es inactiva. Muchas proteínas celulares también son reguladas por la unión a GTP o GDP. Un ejemplo son las proteínas codificadas por el oncogén *ras*, muy estudiadas por su papel en el control de la proliferación celular y en los cánceres humanos. Los análisis mediante cristalografía de rayos X de estas proteínas revelan diferencias conformacionales sutiles pero muy importantes entre la forma inactiva unida a GDP y la forma activa unida a GTP (Fig. 8.38). Estas pequeñas diferencias en la conformación de la proteína determinan que la proteína Ras (en la forma activa unida a GTP) pueda interaccionar con su molécula diana, e inducir la división celular. La importancia de estas diferencias en la conformación de la proteína se muestra en el hecho de que mutaciones en los genes *ras* contribuyen al desarrollo de aproximadamente el 20% de los cánceres humanos. Estas mutaciones alteran la estructura de las proteínas Ras de tal manera que se mantienen indefinidamente en la conformación activa unida a GTP, actuando como una se-

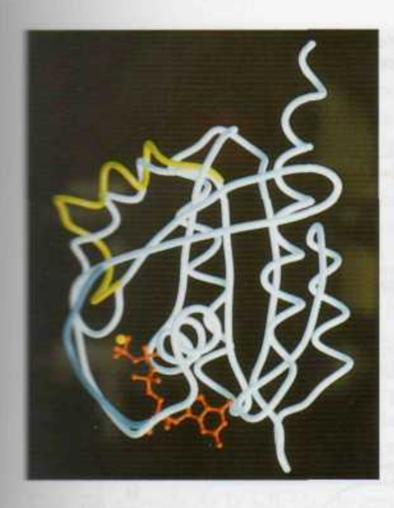


Figura 8.38 Diferencias conformacionales entre proteínas Ras activas e inactivas. Las proteínas Ras alternan entre una forma activa unida a GTP y una inactiva unida a GDP. El principal efecto de la unión a GTP frente a la unión a GDP es el cambio de conformación de dos regiones de la molécula, designadas regiones switch I y switch II. La parte de la proteína que forma complejo con GTP se representa en el dibujo en blanco, y la parte de unión al GDP de switch I y switch II se representan en azul y amarillo, respectivamente. El nucleótido de guanina se representa en rojo y el Mg^{+2} en amarillo. (Cortesía de Sung-Hou Kim, Universidad de California, Berkeley.)

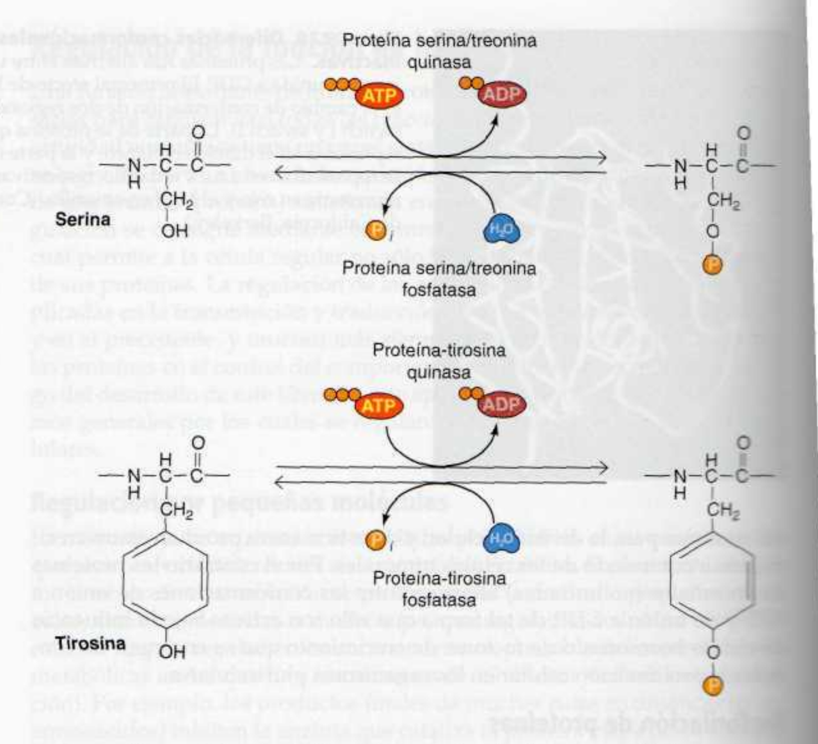
ñal continua para la división celular, y de esta manera promueven un crecimiento incontrolado de las células tumorales. Por el contrario las proteínas Ras normales (no mutadas) alternan entre las conformaciones de unión a GTP y de unión a GDP, de tal forma que sólo son activas bajo la influencia de ciertas hormonas o de factores de crecimiento que se encargan de controlar la proliferación celular en los organismos pluricelulares.

Fosforilación de proteínas

Los ejemplos expuestos en la sección anterior implican uniones no covalentes de las proteínas con pequeñas moléculas inhibidoras o activadoras. Como no se forman enlaces covalentes, la unión de estas moléculas reguladoras a la proteína es reversible, permitiendo que la célula responda rápidamente a los cambios ambientales. Sin embargo, la actividad de muchas proteínas también se regula por modificaciones covalentes. Un ejemplo de este tipo de regulación es la activación de algunas enzimas por escisión proteolítica de precursores inactivos. Ya se ha mencionado previamente en este capítulo que las enzimas digestivas y las proteínas que participan en la coagulación sanguínea y la muerte celular programada se regulan por este mecanismo. Sin embargo, puesto que la proteólisis es un proceso irreversible, es una vía de control de la actividad enzimática en vez de un mecanismo de activación y desactivación de las proteínas en respuesta a cambios ambientales. Por el contrario, otras modificaciones covalentes —en concreto la fosforilación— son procesos reversibles en el interior de la célula, y su función, al igual que la regulación alostérica, es activar o inhibir de manera reversible una gran variedad de proteínas celulares en respuesta a señales ambientales.

La fosforilación de proteínas está catalizada por enzimas **proteína quinasas o proteín quinasas**, la mayoría de las cuales transfieren un grupo fosfato desde el ATP a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de serina, treonina o tirosina (Fig. 8.39). Las proteínas quinasas son una de las familias de proteínas más grandes en eucariotas, constituyendo aproximadamente el 2% de los genes eucariotas. La mayoría de las proteína quinasas fosforilan la serina y la treonina o la tirosina: estas enzimas se llaman **proteína-serina/treonina quinasas** o **proteína-tirosina quinasas**, respectivamente. La fosforilación de las proteínas se revierte por las enzimas **proteína fosfatasas o proteín fosfatasas**, que catalizan la hidrólisis de un grupo fosfato de un aminoácido fosforilado. Como las proteína quinasas, la mayoría de las proteína fosfatasas son específicas de serina y treonina o de tirosina, aunque algunas proteína fosfatasas reconocen cualquiera de los tres fosfoaminoácidos.

Figura 8.39 Proteína quinasas y fosfatasas. Las proteína quinasas catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP a la cadena lateral de la serina y treonina (proteína serina/treonina quinasas) o de la tirosina (proteína-tirosina quinasas). Las proteína fosfatasas catalizan la eliminación mediante hidrólisis de los grupos fosfato de estos mismos aminoácidos.



La acción combinada de la quinasas y las fosfatasas media la fosforilación reversible de muchas proteínas celulares. Con frecuencia las proteína quinasas participan en vías de transducción de señales en las que una quinasa fosforila una segunda quinasa que puede actuar a su vez sobre otra quinasa. La acción secuencial de varias proteína quinasas puede transmitir una señal recibida en la superficie celular a una proteína diana en el interior de la célula, cuyo efecto final son cambios en el comportamiento celular en respuesta a estímulos ambientales.

El modelo de la acción de las proteína quinasas proviene de los estudios realizados por Ed Fischer y Ed Krebs en 1955 sobre el metabolismo del glucógeno. En las células musculares la hormona epinefrina (adrenalina) provoca la degradación del glucógeno a glucosa-1-fosfato, proporcionando energía para la contracción muscular. La glucogenólisis está catalizada por la glucógeno fosforilasa, que está regulada por una proteína quinasa (Fig. 8.40). La epinefrina se une a su receptor en la superficie de la célula desencadenando la conversión de ATP en AMP cíclico (AMPc), el cual se une y activa a una proteína quinasa, llamada proteína quinasa dependiente de AMPc. Esta quinasa fosforila y activa una segunda proteína quinasa denominada fosforilasa quinasa. La fosforilasa quinasa fosforila y activa la enzima glucógeno fosforilasa que conduce a la producción de glucosa. Estas fosforilaciones encadenadas que activan a la fosforilasa quinasa primero y a la glucógeno fosforilasa después, pueden ser revertidas por enzimas fosfatasas específicas, de tal manera que la eliminación del estímulo inicial (epinefrina) inhibe la degradación del glucógeno.

La vía de señalización que provoca la activación de la glucógeno fosforilasa se comienza por regulación alostérica debida a la unión de moléculas pequeñas a sus dianas —la epinefrina se une a su receptor y el AMPc se une a la proteína quinasa dependiente de AMPc—. La señal entonces se transmite a las dianas intracelulares mediante la acción secuencial de las proteína quinasas. Rutas similares, en las que participan enzimas quinasas y fos-

fatasas, están implicadas en la regulación de casi todos los aspectos del comportamiento en las células eucariotas (véanse Caps. 15 y 16). Las alteraciones de estas vías, relacionadas con alteraciones de proteína-tirosina quinasas, también son responsables de muchas enfermedades asociadas con una regulación inadecuada del crecimiento y diferenciación celular, en particular con el desarrollo del cáncer. En efecto, la primera proteína-tirosina quinasa se descubrió en 1980 en trabajos sobre proteínas oncogénicas de virus tumorales animales —en concreto, el virus del sarcoma de Rous— por Tony Hunter y Bartholomew Sefton. En otros estudios posteriores se vincularon diversas anomalías en las proteína-tirosina quinasas con el desarrollo de muchos tipos de cáncer en el ser humano y algunas pequeñas moléculas inhibidoras de estas enzimas representan algunos de los fármacos en desarrollo más prometedores frente al cáncer.

Pese a que la fosforilación es el tipo más frecuente y mejor estudiado de modificación covalente que regula la actividad proteica, otros tipos de modificaciones proteicas también juegan papeles importantes. Éstas incluyen la metilación y acetilación de residuos de lisina y arginina (vistos en el Cap. 7), además de la adición de grupos NO a la cadena lateral de residuos de cisteína (**nitrosilación**) —la adición de grupos NO a las cadenas laterales de los residuos de cisteína (Fig. 8.41)—. Como se indicó anteriormente en este capítulo la glicosilación en *O* de las proteínas nucleares y citosólicas también puede jugar un papel regulador. Adicionalmente, algunas proteínas están reguladas por la unión covalente de pequeños polipéptidos como la ubiquitina y SUMO, estudiadas en la siguiente sección de este capítulo.

Interacciones proteína-proteína

Muchas proteínas están formadas por múltiples subunidades, cada una de las cuales es una cadena polipeptídica independiente. En algunas proteínas las subunidades son idénticas; en otras proteínas las subunidades son dos o más polipéptidos distintos. En cualquier caso la interacción entre los distintos polipéptidos es fundamental en la regulación de la actividad de la proteína. La importancia de estas interacciones es evidente en muchas enzimas alostéricas, como la aspartato transcarbamilasa, en la que la unión de una molécula reguladora altera la conformación de la proteína por cambios en las interacciones entre las subunidades.

Muchas enzimas también están reguladas por interacciones proteína-proteína. Un buen ejemplo es la proteína quinasa dependiente de AMPc, constituida por dos subunidades reguladoras y dos catalíticas (Fig. 8.42). En esta conformación la proteína está inactiva; las subunidades reguladoras inhiben la actividad enzimática de las subunidades catalíticas. La enzima se activa por la unión del AMPc, el cual se une a las subunidades reguladoras

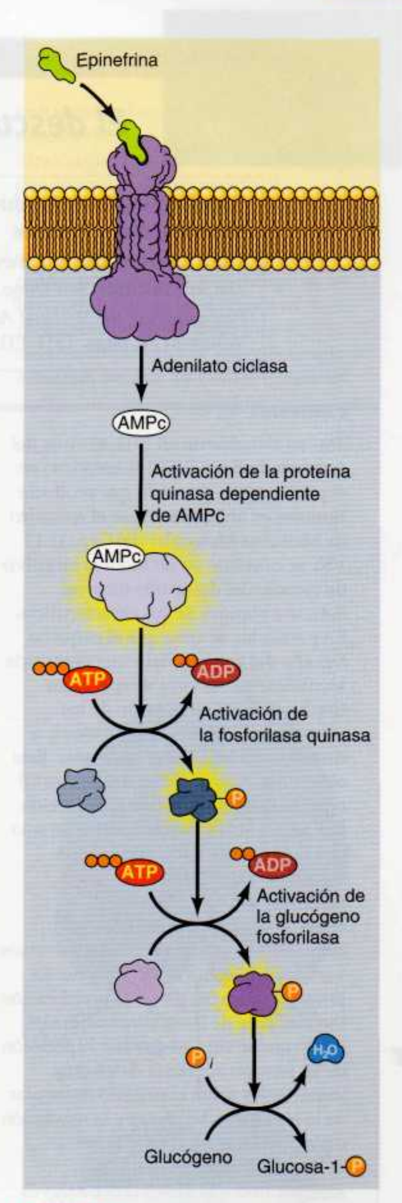


Figura 8.40 Regulación de la degradación del glucógeno por fosforilación de las proteínas. La unión de epinefrina (adrenalina) a receptores de la superficie celular provoca la producción de AMP cíclico (AMPc), que activa una proteína quinasa dependiente de AMPc. Esta enzima fosforila y activa la fosforilasa quinasa que, a su vez, fosforila y activa la glucógeno fosforilasa. La glucógeno fosforilasa cataliza la degradación del glucógeno a glucosa-1-fosfato.

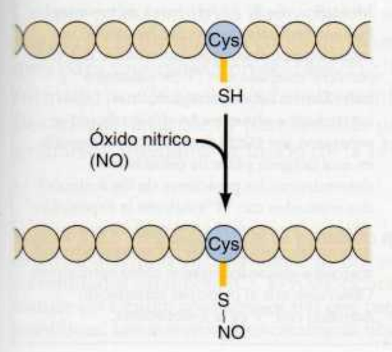


Figura 8.41 Nitrosilación. El óxido nítrico (NO) puede reaccionar con la cadena lateral de los residuos de cisteína.



EXPERIMENTO CLAVE

El descubrimiento de las proteína-tirosina quinasas

Transforming Gene Product of Rous Sarcoma Virus Phosphorylates Tyrosine

Tony Hunter y Bartholomew M. Sefton
The Salk Institute, San Diego, CA
Proceedings of the National Academy of Science, USA, 1980, Volumen 77, págs. 1311-1315



Tony Hunter



Bartholomew M. Sefton

Contexto

Tras su aislamiento en 1911, el virus del sarcoma de Rous (VSR) se convirtió en el primer virus conocido que producía tumores en animales (véase el recuadro de Medicina Molecular del Cap. 1). El VST se convirtió en un modelo atractivo de estudio del desarrollo tumoral debido a algunas de sus características. En particular, se creía que el pequeño tamaño del genoma del virus permitiría identificar genes víricos específicos implicados en la inducción de los procesos proliferativos anómalos que distinguen a las células tumorales. Este objetivo se hizo realidad en los años 70 cuando se determinó que la inducción del desarrollo tumoral requería un solo gen del VSR (denominado *src* por sarcoma). Cabe destacar la identificación de un gen *src* estrechamente relacionado con el anterior en el genoma normal de diversos vertebrados, como el ser humano. La proteína vírica Src dirige la proliferación incontrolada de las células tumorales, por lo que se supuso que la comprensión de su función aportaría datos muy importantes sobre el sustrato molecular de la inducción del cáncer y la regulación de la proliferación celular normal.

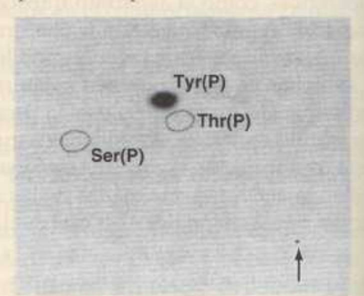
En 1977, Ray Ericsson y cols. identificaron a la proteína Src a través de una técnica de inmunoprecipitación (véase Fig. 4.30) con antisuero de animales portadores de tumores inducidos por el VSR. Poco después, se descubrió que la incubación de los inmunoprecipitados de Src con ATP radioactivo se traducía en la fosforilación de las moléculas de inmunoglobulinas. Por consiguiente, Src parecía actuar como una proteína quinasa, de modo que la fosforilación de proteínas estaría implicada, sin lugar a dudas, en el control de la proliferación celular.

Todas las proteína quinasas descritas hasta ese momento llevaba a cabo reacciones de fosforilación de residuos de serina o treonina, los únicos fosfoaminoácidos identificados en las células animales. Sin embargo, Walter Eckhardt y Tony Hunter habían publicado en 1979 que la proteína oncogénica de otro virus tumoral animal (poliomavirus) se fosforilaba en un residuo de tirosina. Por ello, Hunter y Sefton investigaron la posible fosforilación de residuos de tirosina por acción de Src, en lugar de residuos de serina/treonina, en sus sustratos proteicos. A través de sus experimentos, estos autores lograron demostrar que Src funciona realmente como una proteína-tirosina quinasa, una actividad que actualmente se considera clave en las vías de señalización celular.

Experimentos

Hunter y Sefton identificaron el aminoácido fosforilado por Src mediante la incubación de inmunoprecipitados de Src con ATP marcado con ^{32}P. En esta prueba, el aminoácido fosforilado por Src en la proteína sustrato (en este caso, una inmunoglobulina) incorporaba el isótopo radioactivo. A continuación, se aislaba e hidrolizaba la inmunoglobulina para liberar las moléculas de aminoácido que se analizaban por métodos electroforéticos y cromatográficos para separar fosfotirosina, fosfoserina y fosfotreonina (véase figura). El aminoácido radioactivo detectado en estos experimentos era fosfotirosina, lo que demostraba que Src llevaba a cabo una fosforilación específica de residuos de tirosina.

En otros experimentos se comprobó que la proteína Src de células normales, además de la de origen vírico, actuaba como proteína-tirosina quinasa en las pruebas de inmunoprecipitación. Además, Hunter y Sefton realizaron nuevos experimentos *in vitro* en los que demostraron la presencia de fosfotirosina en proteínas derivadas de células completas. En las células normales, la fosfotirosina tan solo representaba alrededor del 0,03% del conjunto total de fosfoaminoácidos (el resto correspondía a fosfoserina y fosfotreonina), lo que permite entender por qué no se había detectado anteriormente. Sin embargo, la fosfotirosina era unas 10 veces más abundante en las células infectadas por el VSR, lo que señalaba que la capacidad de inducción de la proliferación celular anómala del virus podía atribuirse al aumento de la actividad proteína-tirosina quinasa de la proteína vírica Src.



Identificación de fosfotirosina en inmunoglobulinas fosforiladas por Src. Se incubó un inmunoprecipitado que contenía Src del VSR con ATP marcado con ^{32}P. Se aislaron e hidrolizaron las inmunoglobulinas. Los aminoácidos presentes en el hidrolisado se separaron por electroforesis y cromatografía en una delgada placa de celulosa. Se determinaron las posiciones de los aminoácidos marcados con ^{32}P mediante la exposición de la placa a rayos X. Las líneas discontinuas indican las posiciones de los aminoácidos no marcados que se incluyeron como marcadores. Obsérvese que el principal aminoácido marcado con ^{32}P es la fosfotirosina.

EXPERIMENTO CLAVE

Influencia

El descubrimiento de la actividad proteína-tirosina quinasa de Src supuso la identificación de una nueva actividad de proteína quinasa y la violación de esta actividad con el control de la proliferación celular. Tras la publicación de los hallazgos de Hunter y Sefton, se demostró que muchas otras proteínas de origen vírico funcionaban como proteína-tirosina quinasas, lo que permitió establecer una relación general entre la fosforilación de residuos de tirosina con la proliferación anómala de las células tumorales. Por otra parte, se han logrado identificar numerosas proteína-tirosina quinasas que intervienen en diversas vías de señalización en las células normales en un gran número de estudios realizados a raíz de estos descubrimientos. En algunos trabajos centrados en el mecanismo a través del cual un virus produce cáncer en el pollo se identificó una actividad enzimática hasta entonces desconocida que desempeña una función clave en las vías de señalización que controlan el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de las células. Por otra parte, como se comenta en el Capítulo 18, las proteína-tirosina quinasas codificadas por oncogenes se han convertido en las dianas más prometedoras hasta ahora para el desarrollo de fármacos específicos que actuarían frente a las células tumorales.

provocando un cambio conformacional que conduce a la disociación del complejo; las subunidades catalíticas libres son proteína quinasas enzimáticamente activas. Por tanto el AMPc actúa como un regulador alostérico alterando las interacciones proteína-proteína. Como se estudia en capítulos sucesivos, interacciones proteína-proteína similares, que pueden en sí mismas estar reguladas mediante la unión de pequeñas moléculas y mediante fosforilación, juegan papeles críticos en el control de diversos aspectos del comportamiento celular.

Degradación de proteínas

La cantidad de proteínas en la célula está regulada no sólo por su tasa de síntesis sino también por su tasa de degradación. La vida media de las proteínas celulares es muy variable, desde pocos minutos a varios días, y las diferencias en la tasa de degradación de proteínas es un aspecto importante en la regulación celular. Muchas proteínas que son degradadas rápidamente actúan como moléculas reguladoras, como por ejemplo los factores de transcripción. El rápido reciclaje de estas proteínas es necesario para que sus niveles se ajusten rápidamente en respuesta a los estímulos externos. Otras proteínas se degradan en respuesta a señales específicas, siendo otro mecanismo de regulación de la actividad enzimática intracelular. Además, las proteínas defectuosas o dañadas son reconocidas y rápidamente degradadas en el interior de la célula, por lo que se eliminan las consecuencias de los errores producidos durante la síntesis de proteínas. En células eucariotas son dos las rutas principales que se encargan de la degradación de proteínas: la vía de la ubiquitina-proteasoma y la proteólisis lisosómica.

Vía de la ubiquitina-proteasoma

La ruta principal de la degradación selectiva de proteínas en células eucariotas usa la **ubiquitina** como un marcador de proteínas citosólicas y nucleares para una rápida proteólisis (Fig. 8.43). La ubiquitina es un polipéptido formado por 76 aminoácidos altamente conservado en las células eucariotas (levaduras, animales y plantas). Las proteínas quedan marcadas para su degradación mediante la unión de la ubiquitina al grupo amino de la cadena

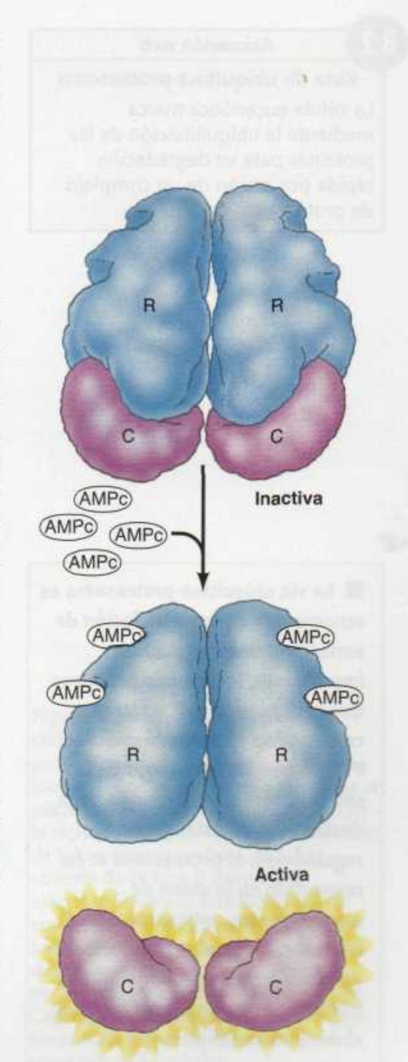
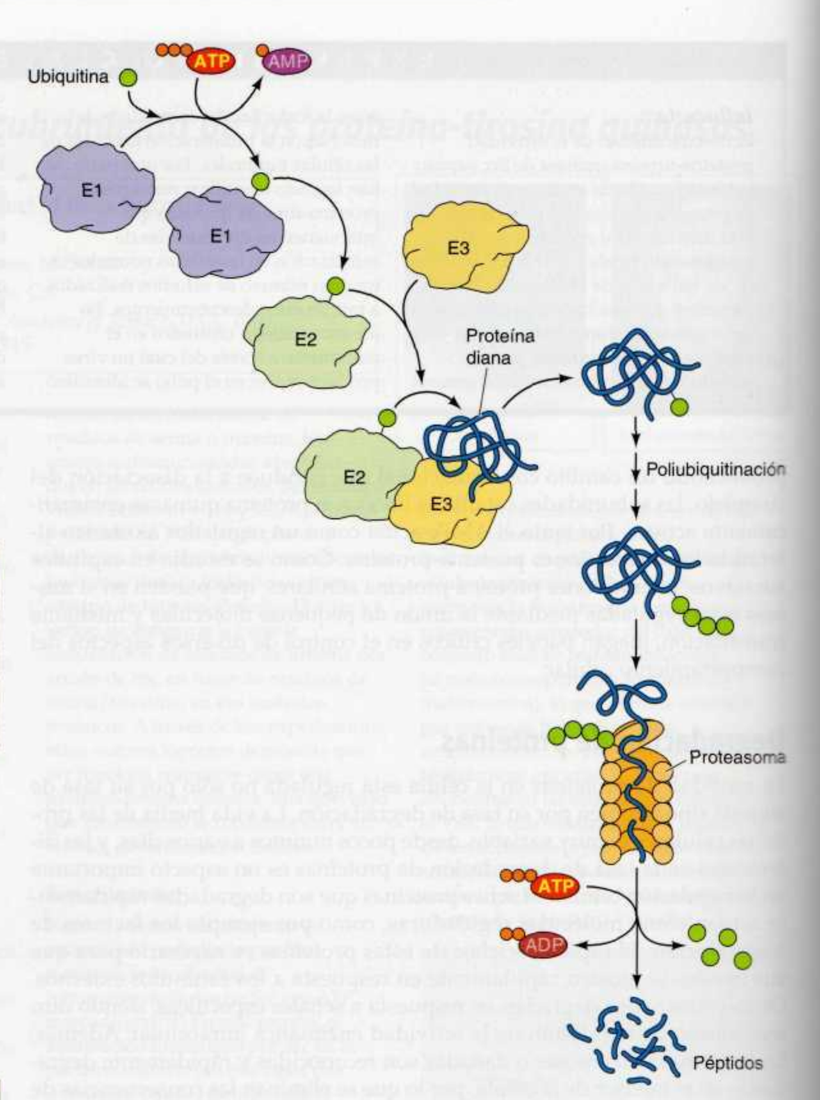


Figura 8.42 Regulación de la proteína quinasa dependiente de AMPc. En el estado inactivo, la enzima consta de dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C). El AMP cíclico se une a las subunidades reguladoras e induce un cambio conformacional que provoca su disociación de las subunidades catalíticas. Las subunidades catalíticas libres son enzimáticamente activas.

Figura 8.43 Vía de la ubiquitina-proteasoma. Las proteínas son marcadas para una rápida degradación mediante la unión covalente de varias moléculas de ubiquitina. La ubiquitina, primero, se activa por la enzima E1. La ubiquitina activada se transfiere a una de las distintas enzimas conjugantes de la ubiquitina (E2). En la mayoría de los casos, la ubiquitina se transfiere posteriormente a la ubiquitina ligasa (E3) y luego a una proteína diana específica. Más moléculas de ubiquitina se añaden posteriormente y la proteína poliubiquitinada es degradada por un complejo con actividad proteasa (proteasoma).



8.2 **Animación web**

Ruta de ubiquitina-proteasoma

La célula eucariótica marca mediante la ubiquitinación de las proteínas para su degradación rápida por acción de un complejo de proteasas

La vía ubiquitina-proteasoma es responsable de la degradación de varias proteínas reguladoras importantes, incluyendo proteínas que controlan la proliferación celular y la supervivencia celular. Puesto que el crecimiento de las células cancerosas depende de la destrucción de estas proteínas reguladoras, el proteasoma se ha convertido en la diana de medicamentos anticancerosos. El Bortezomib fue el primer inhibidor del proteasoma aprobado para el tratamiento de un cáncer humano, el mieloma múltiple.

lateral de un residuo de lisina. Moléculas de ubiquitina adicionales se añaden posteriormente para formar una cadena de varias ubiquitinas. Estas proteínas poliubiquitinadas son reconocidas y degradadas por un gran complejo con múltiples subunidades y con actividad proteasa llamado **proteasoma**. En este proceso la ubiquitina se libera, de tal manera que puede reutilizarse para otro ciclo de degradación de proteínas. Es de destacar que tanto la unión de la ubiquitina como la degradación de las proteínas marcadas requieren energía en forma de ATP.

Debido a que la unión de la ubiquitina marca las proteínas para una inmediata degradación, la estabilidad de muchas proteínas se determina por su capacidad para ubiquitinarse. La ubiquitinación es un proceso que ocurre en varias etapas. En primer lugar, la ubiquitina es activada por la unión a una enzima activadora de ubiquitina, E1. La ubiquitina posteriormente se transfiere a una segunda enzima denominada enzima conjugante de la ubiquitina (E2). A continuación, la ubiquitina se transfiere a la proteína diana por acción de una tercera enzima, denominada ubiquitina ligasa o E3, que es

responsable del reconocimiento selectivo de las proteínas sustrato apropiadas. La mayoría de las células contienen un único tipo de enzima E1, pero tienen varios tipos de E2 y varias familias de enzimas E3. Distintos miembros de la familia de enzimas E3 reconocen distintos sustratos de proteínas, y es la especificidad de estas enzimas lo que marca selectivamente las proteínas celulares para la degradación por el complejo ubiquitina-proteasoma.

Un gran número de proteínas que controlan procesos celulares fundamentales, como la expresión génica y la proliferación celular, son dianas para los procesos de ubiquitinación y proteólisis. Un ejemplo interesante de esta degradación controlada lo proporcionan las proteínas (conocidas como ciclinas) que regulan la progresión a través del ciclo celular de las células eucariotas (Fig. 8.44). La entrada en mitosis de las células eucariotas está controlada en parte por la ciclina B, que es una subunidad reguladora de una proteína quinasa llamada Cdk1 (véase Cap. 16). La asociación de la ciclina B con la enzima Cdk1 es necesaria para la activación de la quinasa Cdk1, que inicia los procesos que ocurren en la mitosis (incluyendo la condensación de los cromosomas y el desensamblaje de la envoltura nuclear) mediante la fosforilación de varias proteínas celulares. La Cdk1 también activa un sistema de proteólisis mediada por ubiquitina que degrada la ciclina B cerca del final de la mitosis. La degradación de la ciclina B inactiva a Cdk1, permitiendo que la célula salga de la mitosis y entre en la interfase

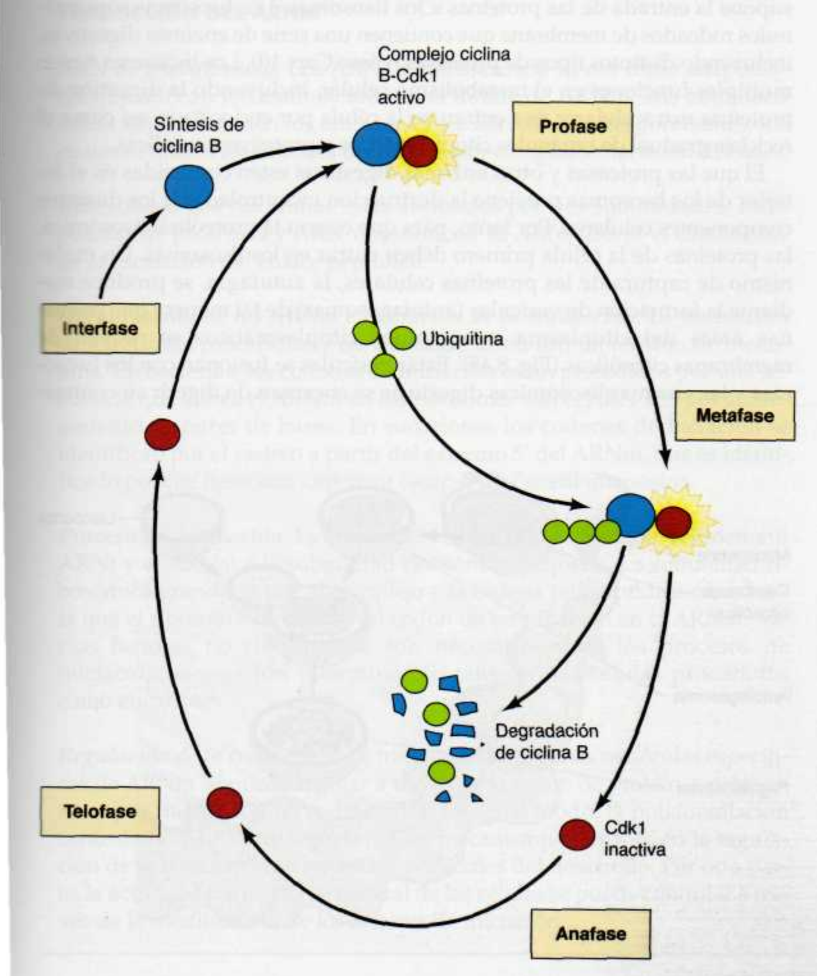


Figura 8.44 Degradación de la ciclina durante el ciclo celular. La progresión de las células eucariotas a través del ciclo celular es controlada en parte por la síntesis y degradación de la ciclina B, una subunidad reguladora de la proteína quinasa Cdk1. La síntesis de ciclina B durante la interfase lleva a la formación de un complejo activo ciclina B-Cdk1 que induce la entrada en mitosis. La degradación rápida de la ciclina B provoca la inactivación de la quinasa Cdk1, permitiendo que la célula salga de mitosis y entre en la interfase del siguiente ciclo celular.

del siguiente ciclo celular. La ubiquitinación de la ciclina B es un proceso altamente selectivo, guiado por una secuencia de nueve aminoácidos en la ciclina B llamada caja de destrucción. Las mutaciones de esta secuencia impiden la proteólisis de la ciclina B, lo que provoca que la célula se detenga en la mitosis. De esta manera se demuestra la importancia de la degradación de proteínas en el control de los procesos de la división celular.

Pese a que la ubiquitinación generalmente dirige las proteínas hacia la degradación, la adición de ubiquitina a algunas proteínas puede cumplir otras funciones. Por ejemplo, la adición de moléculas sencillas de ubiquitina a algunas proteínas interviene en la regulación de la reparación y la transcripción del ADN y la endocitosis. Asimismo, las proteínas pueden modificarse por la unión de otras proteínas similares a la ubiquitina, como SUMO (*small ubiquitin-related modifier*). SUMO y otras proteínas similares a la ubiquitina no marcan a las proteínas para su degradación, sino que actúan como marcadores de localización proteica y reguladores de la actividad proteica. Muchas de las proteínas modificadas con SUMO son factores de transcripción y otras proteínas nucleares que intervienen en el mantenimiento de la estructura de la cromatina y la reparación del ADN.

Proteólisis lisosómica

La otra ruta principal de degradación de proteínas en las células eucariotas supone la entrada de las proteínas a los **lisosomas**. Los lisosomas son orgánulos rodeados de membrana que contienen una serie de enzimas digestivas, incluyendo distintos tipos de proteasas (véase Cap. 10). Los lisosomas tienen múltiples funciones en el metabolismo celular, incluyendo la digestión de proteínas extracelulares que entran en la célula por endocitosis, así como el reciclaje gradual de orgánulos citoplasmáticos y proteínas citosólicas.

El que las proteasas y otras enzimas digestivas estén contenidas en el interior de los lisosomas previene la destrucción incontrolada de los distintos componentes celulares. Por tanto, para que ocurra la proteólisis lisosómica, las proteínas de la célula primero deben entrar en los lisosomas. Un mecanismo de captura de las proteínas celulares, la **autofagia**, se produce mediante la formación de vesículas (autofagosomas) de tal manera que pequeñas áreas del citoplasma u orgánulos citoplasmáticos se rodean de membranas citosólicas (Fig. 8.45). Estas vesículas se fusionan con los lisosomas y las enzimas lisosómicas digestivas se encargan de digerir su conteni-

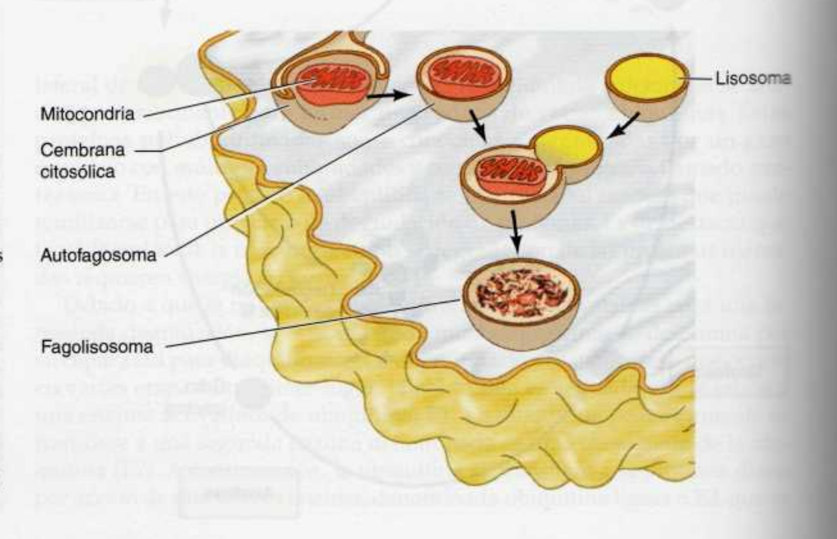


Figura 8.45 Autofagia. Los lisosomas contienen varios tipos de enzimas digestivas, incluyendo proteasas. Los lisosomas capturan las proteínas mediante la fusión de éstos con vesículas autofagosómicas. Éstas se forman al quedar envueltas zonas del citoplasma o distintos orgánulos en vesículas membranosas originadas en las membranas citosólicas. Esta fusión origina un fagolisosoma que digiere el contenido del autofagosoma.

do. La captura de la mayoría de las proteínas en los autofagosomas parece ser un proceso no selectivo, con lo cual ocasiona una degradación de proteínas citosólicas de vida larga. Sin embargo, algunos orgánulos, como las mitocondrias dañadas, pueden marcarse de forma selectiva para su degradación autofágica.

La autofagia está regulada en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y durante el desarrollo de los organismos multicelulares. La autofagia generalmente se activa bajo condiciones de ausencia de nutrientes, permitiendo a las células degradar proteínas no esenciales y orgánulos para que puedan reutilizarse sus componentes. Además, la autofagia juega un papel importante en diversos procesos del desarrollo, como la metamorfosis de insectos, que implica una amplia remodelación de los tejidos y degradación de componentes celulares. Como se ha abordado en el Capítulo 7, la autofagia también desempeña un papel destacado en la muerte celular programada y las anomalías relacionadas con la autofagia se han vinculado con diversos trastornos en el ser humano, como enfermedades neurogenerativas y cáncer.

RESUMEN

TRADUCCIÓN DEL ARNm

ARN de transferencia: Los ARN de transferencia sirven como adaptadores que alinean los aminoácidos en el molde de ARNm. Las aminoacil ARNt sintetasas unen los aminoácidos a los ARNt correspondientes, los cuales se unen a los codones del ARNm por complementariedad de bases.

Ribosomas: Los ribosomas están formados por dos subunidades, compuestas de proteínas y ARN ribosómicos. El ARNr 23S es el catalizador de la formación del enlace peptídico.

Organización de los ARNm e iniciación de la traducción: La traducción de los ARNm procariotas y eucariotas se inicia con un residuo de metionina. En bacterias, los codones de iniciación están precedidos por una secuencia que alinea el ARNm en los ribosomas con el ARN 16S por apareamiento de pares de bases. En eucariotas, los codones de inciación se identifican por el rastreo a partir del extremo 5′ del ARNm, que es identificado porque tiene una caperuza («cap») de 7-metil guanosina.

Proceso de traducción: La traducción se inicia por la unión del metionil ARNt y el ARNm a la subunidad ribosómica pequeña. La subunidad ribosómica grande se une al complejo y la cadena polipeptídica crece hasta que el ribosoma encuentra un codón de terminación en el ARNm. Varios factores no ribosómicos son necesarios para los procesos de iniciación, elongación y terminación tanto en las células procariotas como eucariotas.

Regulación de la traducción: La traducción de algunas moléculas específicas de ARNm se puede regular a través de la unión de proteínas represoras y por microARN no codificantes. De igual modo, la poliadenilación controlada del ARNm representa un mecanismo relevante en la regulación de la traducción en los estadios iniciales del desarrollo. Por otra parte, la actividad traduccional general de las células se puede controlar a través de la modificación de los factores de iniciación.

PALABRAS CLAVE

ARNt, anticodón, aminoacil ARNt sintetasa

ribosoma, ARNr

región 5′ no codificante (UTR), policistrónico, monocistrónico, región 3′ no codificante secuencia Shine-Dalgarno

factor de iniciación, factor de elongación, factor de liberación, polisoma

Interferencia de ARN (iARN)
ARN de interferencia pequeño (ARNsi)
microARN (ARNmi)

PALABRAS CLAVE	RESUMEN
	PLEGAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE PROTEÍNAS
chaperona	*Chaperonas y plegamiento de proteínas*: Las chaperonas moleculares facilitan el plegamiento proteico mediante su unión y estabilización de las cadenas polipeptídicas sin plegar o parcialmente plegadas.
proteína disulfuro isomerasa (PDI), preptidil prolil isomerasa	*Enzimas que catalizan el plegamiento proteico*: Al menos dos tipos de enzimas, la proteína disulfuro isomerasa y la peptidil prolil isomerasa, catalizan el plegamiento de proteínas.
proteólisis, secuencia señal, peptidasa de señal	*Escisión de proteínas*: La proteólisis es un mecanismo importante en el procesamiento de muchas proteínas. Por ejemplo, las proteínas secretadas y las proteínas incorporadas a la mayoría de los orgánulos son marcadas para dirigirse a sus destinos mediante secuencias amino terminales que son eliminadas por escisión de proteínas cuando las cadenas polipeptídicas pasan a través de la membrana.
glicosilación, glicoproteína, dolicol fosfato	*Glicosilación*: Muchas proteínas eucariotas, en particular las secretadas y las incorporadas a la membrana plasmática, son modificadas por la adición de carbohidratos en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi.
***N*-miristoilación, prenilación, palmitoilación, glicolípido, glicosilfosfatidilinositol (GPI)**	*Unión de lípidos*: Con frecuencia, la unión de lípidos por enlaces covalentes marca y ancla las proteínas a la membrana plasmática.
	REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS
regulación alostérica	*Regulación por pequeñas moléculas*: Muchas proteínas están reguladas por la unión de pequeñas moléculas, como aminoácidos y nucleótidos, que inducen cambios en la conformación y actividad de las proteínas.
proteína quinasa, proteína serina/treonina quinasa, proteína tirosina quinasa, proteína fosfatasa, nitrosilación.	*Fosforilación de proteínas*: La fosforilación reversible controla la actividad de una gran variedad de proteínas celulares, y es debida a la actividad de proteína quinasas y fosfatasas. Otras modificaciones, como la nitrosilación, también regulan las actividades de algunas proteínas.
	Interacciones proteína-proteína: Las interacciones entre las cadenas polipeptídicas son importantes en la regulación de las enzimas alostéricas y de otras proteínas celulares.
	DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS
ubiquitina, proteasoma	*Ruta de la ubiquitina-proteasoma*: El principal mecanismo selectivo de degradación de proteínas en las células eucariotas utiliza la ubiquitina como un marcador que etiqueta las proteínas para una rápida proteólisis por el proteasoma.
lisosoma, autofagia	*Proteólisis lisosómica*: Las proteasas lisosómicas degradan las proteínas extracelulares captadas mediante endocitosis y son las responsables de la lenta degradación de orgánulos citoplasmáticos y de proteínas citosólicas mediante autofagia. Algunas proteínas son marcadas para su degradación y desempeñan una función destacada en el desarrollo celular y la muerte celular programada.

Preguntas

1. *E. coli* contiene 64 codones diferentes en sus ARNm, 61 de los cuales codifican aminoácidos. ¿Cómo pueden sintetizar proteínas si sólo poseen 40 ARNt diferentes?

2. Desea expresar un ADNc (ADN complementario) eucariótico clonado en bacterias. ¿Qué tipo de secuencia debe añadir para que ese ARNm sea traducido por los ribosomas procariotas?

3. Discute las evidencias de que el ARN ribosómico es el principal componente catalítico del ribosoma.

4. ¿Qué efecto tendría un inhibidor de la poliadenilación sobre la síntesis proteica en óvulos fertilizados?

5. ¿Qué son las chaperonas? ¿Por qué es beneficioso para la síntesis de las proteínas de choque térmico ser inducidas mediante la exposición de las células a temperaturas elevadas?

6. Estás interesado en el estudio de una proteína expresada en la superficie de los hepatocitos. ¿Cómo podrías determinar, tratando estas células con una fosfolipasa, si estas proteínas son transmembrana o si están unidas a la superficie celular mediante el GPI?

7. ¿Cuál es la evidencia de que la ubiquitinación y degradación de proteínas específicas por proteosomas requiere una secuencia diana específica en la proteína?

8. ¿La ubiquitinación de una proteína siempre señaliza su destrucción por parte del proteosoma?

9. ¿Cómo regulan los miARN la traducción de ARNm específicos?

10. ¿Cuál es la función de las regiones no traducidas del extremo 3′ en los ARNm?

11. ¿Por qué Noller y sus colaboradores usaron ribosomas de *T. aquaticus* para sus estudios?

12. ¿Por qué es importante la escisión proteolítica regulada para la actividad de determinadas proteínas?

13. ¿Cómo asegura el ribosoma que se inserta el aminoacil ARNt correcto en el codón opuesto?

14. Estás estudiando la vía responsable de la secreción de ribonucleasa (ARN-asa) en células pancreáticas en cultivo, estudiando la actividad de la ARNasa secretada al medio de cultivo. ¿Cómo afectaría la expresión de ARNsi dirigido frente a la proteína disulfuro isomerasa (PDI), a la cantidad de ARNasa activa que detectas en tus experimentos?

Bibliografía

Traducción del ARNm

Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore and T. A. Steitz. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905–920. [P]

Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297. [R]

Beringer, M. and M. V. Rodnina. 2007. The ribosomal peptidyl transferase. *Mol. Cell* 26: 311–321. [R]

Bushati, N. and S. M. Cohen. 2007. microRNA functions. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 175–205. [R]

Crick, F. H. C. 1966. Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19: 548–555. [P]

Gebauer, F. and M. W. Hentze. 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 827–835. [R]

Holcik, M. and N. Sonenberg. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Rev. Cel Mol. Biol.* 6: 318–327. [R]

Hopper, A. K. and E. M. Phizicky. 2003. tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev.* 17:162–180. [R]

Ibba, M. and D. Soll. 2004. Aminoacyl-tRNAs: Setting the limits of the genetic code. *Genes Dev.* 18: 731–738. [R]

Kloosterman, W. P. and R. H. A. Plasterk. 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev. Cell* 11: 441–450. [R]

Laursen, B. S., H. P. Sorensen, K. K. Mortensen and H. U. Sperling-Petersen. 2005. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 101–123. [R]

Nilsen, T. W. 2007. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 23: 243–249. [R]

Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920–930. [P]

Noller, H. F., V. Hoffarth and L. Zimniak. 1992. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256: 1416–1419. [P]

Nomura, M. 1997. Reflections on the days of ribosome reconstitution research. *Trends Biochem. Sci.* 22: 275–279. [R]

Richter, J.D. 2007. CPEB: a life in translation. *Trends Biochem. Sci.* 32: 279–285. [R]

Richter, J. D. and N. Sonenberg. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433: 477–480. [R]

Rodriguez, A. J., K. Czaplinski, J. S. Condeelis and R. H. Singer. 2008. Mechanisms and cellular roles of local protein synthesis in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 144–149. [R]

Saks, M. E., J. R. Sampson and J. N. Abelson. 1994. The transfer RNA identity problem: A search for rules. *Science* 263: 191–197. [R]

Stefani, G. and F. J. Slack. 2008. Small noncoding RNAs in animal development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 219–230. [R]

Steitz, T. A. 2008. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 242 – 253. [R]

Van Rooij, E., N. Liu and E. N. Olson. 2008. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet.* 24: 159–166. [R]

Wu, L. and J. G. Belasco. 2008. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 29: 1–7. [R]

Plegamiento y procesamiento de proteínas

Ellis, R. J. 2006. Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem. Sci.* 31: 395–401. [R]

Farazi, T. A., G. Waksman and J. I. Gordon. 2001. The biology and enzymology of protein *N*-myristoylation. *Ann. Rev. Biochem.* 276: 39501–39504. [R]

Hebert, D. N., S. C. Garman and M. Molinari. 2005. The glycan code of the endoplasmic reticulum: Asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol.* 15: 364–370. [R]

Helenius, A. and M. Aebi. 2004. Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 1019–1049. [R]

Horwich, A. L., W. A. Fenton, E. Chapman and G. W. Farr. 2007. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 115–145. [R]

Iyer, S. P. N. and G. W. Hart. 2003. Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: Enzymes of *O*-GlcNAc cycling. *Biochem.* 42: 2493–2499. [R]

Lane, K. T. and L. S. Beese. 2006. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J. Lipid Res.* 47: 681–699. [R]

Maeda, Y. and T. Kinoshita. 2008. Dolichol-phosphate mannose synthase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1780: 861–868. [R]

Magee, T. and M. C. Seabra. 2005. Fatty acylation and prenylation of proteins: what's hot in fat. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 190–196. [R]

Ohtsubo, K. and J. D. Marth. 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855–867. [R]

Paetzel, M., A. Karla, N. C. Strynadka and R. E. Dalbey. 2002. Signal peptidases. *Chem. Rev.* 102: 4549–4580. [R]

Roth, J. 2002. Protein *N*-glycosylation along the secretory pathway: Relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem. Rev.* 102: 285–303. [R]

Schiene, C. and G. Fischer. 2000. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 10: 40–45. [R]

Udenfriend, S. and K. Kodukula. 1995. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 563–591. [R]

Wandinger, S. K., K. Richter and J. Buchner. 2008. The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 283: 18473–18477. [R]

Wilkinson, B. and H. F. Gilbert. 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1699: 35–44. [R]

Wright, L. P. and M. R. Philips. 2006. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J. Lipid Res.* 47: 883–891. [R]

Yan, A. and W. J. Lennarz. 2005. Unraveling the mechanism of protein *N*-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 280: 3121–3124. [R]

Young, J. C., V. R. Agashe, K. Siegers and F. U. Hartl. 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 781–791. [R]

Regulación de la función de las proteínas

Alonso, A., J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon and T. Mustelin. 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117: 699–711. [R]

Barford, D. 1996. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 21: 407–412. [R]

Fauman, E. B. and M. A. Saper. 1996. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 21: 413–417. [R]

Fischer, E. H. and E. G. Krebs. 1989. Commentary on "The phosphorylase β to α converting enzyme of rabbit skeletal muscle." *Biochim. Biophys. Acta* 1000: 297–301. [R]

Hanks, S. K., A. M. Quinn and T. Hunter. 1988. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42–52. [R]

Hess, D. T., A. Matsumoto, S.-O. Kim, H. E. Marshall and J. S. Stamler. 2005. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 150–166. [R]

Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225–236. [R]

Huse, M. and J. Kuriyan. 2002. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109: 275–282. [R]

Manning, G., G. D. Plowman, T. Hunter and S. Sudarsanam. 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27: 514–520. [R]

Marianayagam, N. J., M. Sunde and J. M. Matthews. 2004. The power of two: Protein dimerization in biology. *Trends Biochem. Sci.* 29: 618–625. [R]

Milburn, M. V., L. Tong, A. M. DeVos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura and S.-H. Kim. 1990. Molecular switch for signal transduction: Structural differences between active and inactive forms of protooncogenic *ras* proteins. *Science* 247: 939–945. [P]

Monod, J., J.-P. Changeux and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6: 306–329. [P]

Taylor, S. S., D. R. Knighton, J. Zheng, L. F. R. Eyck and J. M. Sowadski. 1992. Structural framework for the protein kinase family. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 429–462. [R]

Vetter, I. R. and A. Wittinghofer. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294: 1299–1304. [R]

Degradación de proteínas

Gil, G. 2004. SUMO and ubiquitin in the nucleus: Different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.* 18: 2046–2059. [R]

Glotzer, M., A. W. Murray and M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132–138. [P]

Hilgarth, R. S., L. A. Murphy, H. S. Skaggs, D. C. Wilkerson, H. Xing and K. D. Sarge. 2004. Regulation and function of SUMO modification. *J. Biol. Chem.* 279: 53889–53902. [R]

Johnson, E. S. 2004. Protein modification by SUMO. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 355–382. [R]

Kerscher, O., R. Felberbaum and M. Hochstrasser. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 159–180. [R]

Klionsky, D. J. 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 931–937. [R]

Mizushima, N., B. Levine, A. M. Curevo and D. J. Klionsky. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451: 1069–1075. [R]

Mukhopadhyay, D. and H. Reizman. 2007. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315: 201–205. [R]

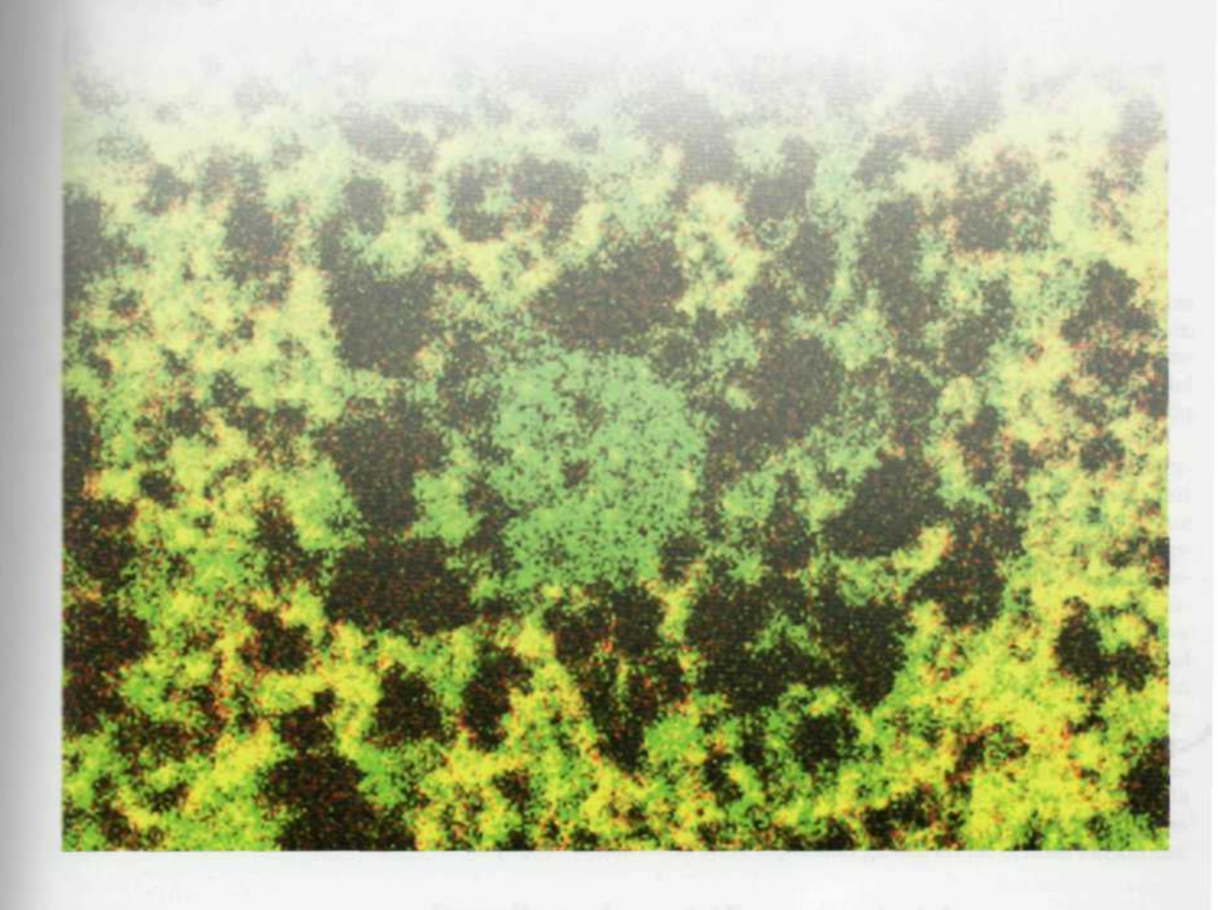
Pickart, C. M. and R. E. Cohen. 2004. Proteasomes and their kin: Proteases in the machine age. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 177–187. [R]

Reed, S. I. 2003. Ratchets and clocks: The cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 855–864. [R]

Welchman, R. L., C. Gordon and R. J. Mayer. 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature Rev. Mol. Cell Biol* 6: 599–609. [R]

SECCIÓN III

Estructura y función celulares



CAPÍTULO 9

Núcleo

La existencia del núcleo es la característica principal que diferencia las células eucariotas de las células procariotas. Por contener el genoma celular, el núcleo sirve de almacén de la información genética y como centro de control celular. La replicación del ADN, la transcripción y el procesamiento del ARN ocurren en el interior del núcleo, y sólo la última etapa de la expresión génica (traducción) tiene lugar en el citoplasma.

Debido a que la envuelta nuclear separa el genoma del citoplasma, la expresión génica está regulada por mecanismos exclusivos de los organismos eucariotas. Mientras que los ARNm procariotas son traducidos a la vez que ocurre la transcripción, los ARNm eucariotas sufren procesos postranscripcionales antes de ser transportados desde el núcleo al citoplasma. La presencia de un núcleo, por tanto, permite que la expresión génica sea regulada por mecanismos postranscripcionales, como el *splicing* alternativo. Debido a que la envuelta nuclear limita el acceso de las proteínas al material genético, proporciona nuevas posibilidades para el control de la expresión génica a nivel de la transcripción. Por ejemplo, la expresión de algunos genes eucariotas se controla a través de la regulación del transporte de los factores de transcripción desde el citoplasma al núcleo —un mecanismo de regulación transcripcional inexistente en procariotas—. Por tanto, la separación entre el genoma y el lugar de la traducción del ARNm desempeña un papel fundamental en la expresión génica en las células eucariotas.

Envuelta nuclear y tráfico entre el núcleo y el citoplasma

La envuelta nuclear separa el contenido del núcleo del citoplasma y proporciona un armazón estructural al núcleo. Las membranas nucleares actúan como una barrera selectiva que impide el libre paso de las moléculas entre el interior nuclear y el citoplasma, manteniéndolos como dos compartimentos metabólicamente independientes. Los únicos canales en la envuelta nuclear están representados por los complejos de poro nucleares, que permiten un intercambio controlado de moléculas entre el núcleo y el citoplasma. El tráfico selectivo de proteínas y ARN a través de los complejos de poro nucleares no sólo mantiene la composición interna del núcleo sino que tiene un papel clave en la regulación de la expresión génica.

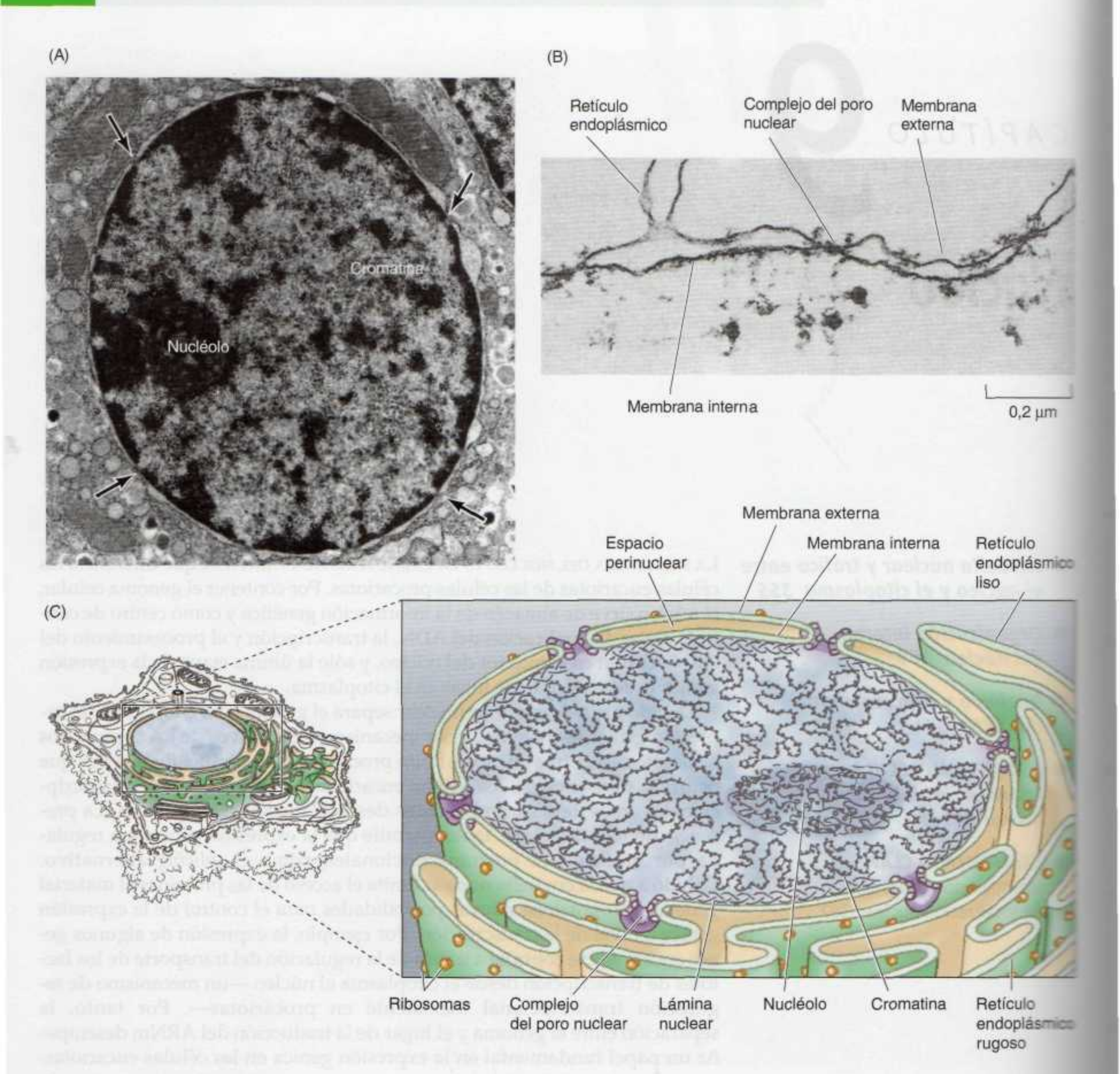


Figura 9.1 Envuelta nuclear. (A) Micrografía electrónica de un núcleo. Las membranas nucleares interna y externa se unen en los complejos del poro nuclear (flechas). (B) La micrografía electrónica muestra la continuidad de la membrana nuclear externa con el retículo endoplásmico. (C) Esquema de la envuelta nuclear. La membrana nuclear interna está en contacto con la lámina nuclear, que sirve de anclaje para la cromatina. (A, David M. Phillips/Photo Researchers, Inc; B, cortesía del Dr. Werner W. Franke, German Cancer Research Center, Heidelberg.)

Estructura de la envuelta nuclear

La **envuelta nuclear** posee una estructura compleja, constituida por dos membranas nucleares, la lámina nuclear en su cara interna y por los complejos de poro nucleares (Fig. 9.1). El núcleo está delimitado por un sistema de dos membranas concéntricas, las **membranas nucleares** interna y externa. La membrana nuclear externa se continúa con la membrana del retículo endoplásmico, por lo que hay una comunicación directa entre el espacio intermembrana y el lumen del retículo endoplásmico. Además la membrana nuclear externa es funcionalmente similar a la del retículo endoplásmico (véase Cap. 10) y también posee ribosomas adheridos a su superficie citoplasmática, si bien su composición proteica es ligeramente diferente, ya que es rica en proteínas de membrana que se unen al citoesqueleto y carece de las proteínas que mantienen la organización cilíndrica del RE. Por el contra-

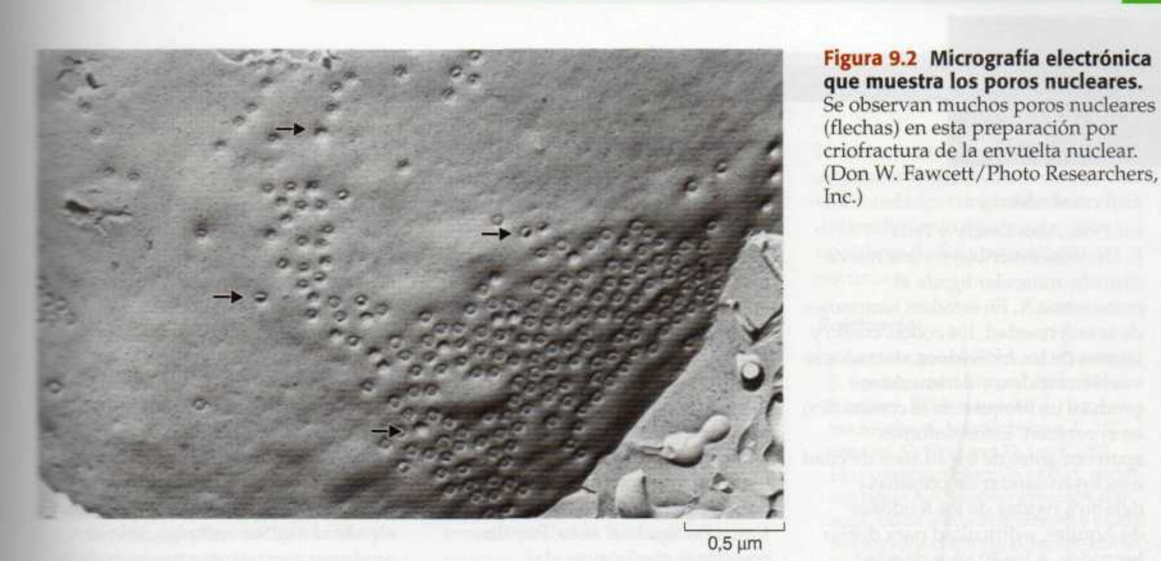


Figura 9.2 Micrografía electrónica que muestra los poros nucleares. Se observan muchos poros nucleares (flechas) en esta preparación por criofractura de la envuelta nuclear. (Don W. Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

rio, la membrana nuclear interna tiene proteínas únicas que son específicas para el núcleo, como aquellas que unen la matriz nuclear de láminas (estudiada más adelante).

La función principal de las membranas nucleares es actuar como una barrera que separa el contenido del interior nuclear del citoplasma. Como otras membranas celulares, la membrana nuclear es una bicapa fosfolipídica, permeable sólo a pequeñas moléculas apolares (véase Fig. 2.27). Otras moléculas son incapaces de difundir a través de esta bicapa fosfolipídica. Las membranas interna y externa se unen en los complejos de poro nuclear, siendo los únicos canales que permiten el paso de pequeñas moléculas polares y de macromoléculas a través de la envuelta nuclear (Fig. 9.2). Como se estudiará en la sección siguiente, el complejo del poro nuclear es una estructura compleja responsable del tráfico selectivo de proteínas y de ARN entre el núcleo y el citoplasma.

Subyacente a la membrana nuclear interna se localiza la **lámina nuclear**, una red fibrosa que proporciona soporte estructural al núcleo (Fig. 9.3). La

Los eritrocitos (glóbulos rojos) en mamíferos carecen de núcleo. A medida que se desarrollan a partir de células precursoras, el núcleo se extruye del eritrocito.

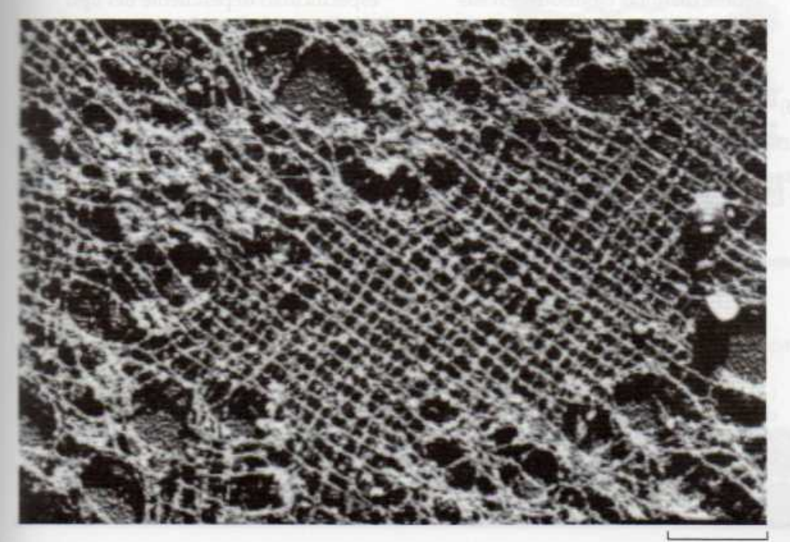
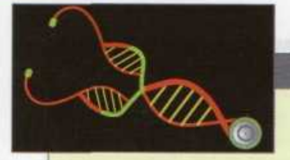


Figura 9.3 Micrografía electrónica de la lámina nuclear. La lámina es una red de filamentos por debajo de la membrana nuclear interna. (De U. Aebi, L. Cohn, L. Buhle y L. Gerace, 1986. *Nature* 323:560.)



MEDICINA MOLECULAR

Enfermedades de la lámina nuclear

Enfermedades

En 1966, Alan Emery y Fritz E. Dreifuss describieron una nueva distrofia muscular ligada al cromosoma X. En estadios tempranos de la enfermedad, los codos, cuello y talones de los individuos afectados se vuelven rígidos, y a menudo se produce un bloqueo de la conducción en el corazón. Estos síntomas aparecen antes de los 10 años de edad e incluyen «andar de puntillas» debido a rigidez de los tendones de Aquiles, y dificultad para doblar los codos. A los 20 años de edad han aparecido problemas cardíacos y puede ser necesario un marcapasos. Se produce una debilidad y degeneración gradual de los músculos del hombro y brazo superior y de los músculos de la pantorrilla, pero esto tiene lugar lentamente y a menudo no supone un problema hasta tarde en la vida.

Casi 30 años más tarde, los investigadores demostraron que mutaciones en una nueva proteína transmembrana eran responsables de esta distrofia muscular ligada al cromosoma X de Emery-Dreifuss. Denominaron a la proteína emerina, en honor a Alan Emery. Poco después, varios grupos encontraron que la emerina era una proteína localizada en la membrana nuclear interna y ausente en pacientes con la distrofia muscular ligada al cromosoma X de Emery-Dreifuss. Esto era inesperado; las mutaciones en una proteína de la envuelta nuclear expresada en todas las células, aparentemente causaba una enfermedad específica de tejido. Mientras que todas las células del cuerpo carecían de la proteína, la patología sólo se producía en el músculo. Investigadores posteriores encontraron que la misma distrofia también podía heredarse de una forma no ligada al sexo. Familias con esta distrofia muscular de Emery-Dreifuss no ligada al sexo, poseían mutaciones en *LMNA*, el gen único que codifica las láminas A y C. Así, mutaciones en dos genes, uno que codifica una proteína de la membrana nuclear interna y otro que codifica una de las principales láminas nucleares, causaban una distrofia muscular clínicamente idéntica.

Más sorprendente fue que investigaciones paralelas sobre distintas enfermedades, la lipodistrofia parcial de tipo Dunnigan y el trastorno de Charcot-Marie-Tooth de tipo 2B1, las situó en distintas mutaciones del gen *LMNA*. Anteriormente, los médicos clasificaban a estas enfermedades como distintas basándose en sus características clínicas y en su herencia. Trabajos recientes demuestran que las mutaciones de otra proteína de la membrana nuclear interna, el receptor para la lámina B, son la base para la Anomalía de Pelger-Huët.

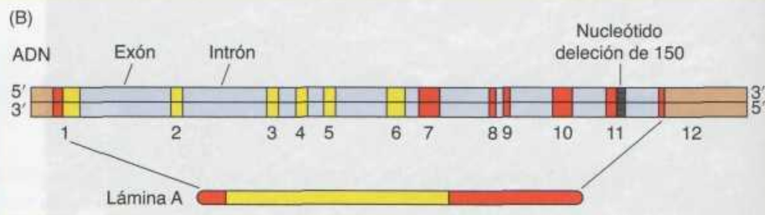
Bases moleculares y celulares

La mayoría de los biólogos creían que las mutaciones en las láminas causarían defectos generalizados sobre la arquitectura nuclear y serios problemas en células que se dividen rápidamente. Sin embargo, sólo se producen aberraciones menores de la estructura nuclear en estos pacientes. Así, el misterio es cómo mutaciones en las láminas nucleares o proteínas de unión a las láminas, causan diferentes enfermedades tejido-específicas. La respuesta todavía no se conoce pero existen dos hipótesis principales. La primera es la hipótesis de la «expresión génica». Esta defiende que la correcta interacción entre las dos proteínas láminas A y C, con la envuelta nuclear es esencial para la expresión normal y específica de tejido, de ciertos genes. Los genes transcripcionalmente inactivos se localizan preferentemente en la periferia nuclear, mientras que los genes expresados se concentran en el centro del núcleo con una especificidad dependiente del tipo celular. Así, la base de estas

(A)



(B)



(A) Un niño con progeria de Hutchinson-Gilford. (B) Diagrama de la estructura intrón-exón del gen *LMNA* y la proteína laminina A, con los dominios globulares indicados en rojo y los dominios en forma de bastón en amarillo. En el gen mutante mostrado, el gen posee una deleción de 150pb (negro) en el exón 11. (A, cortesía de Maggie Barlett, NHGRI).

MEDICINA MOLECULAR

enfermedades sería un cambio en la expresión génica causada por interacciones proteicas defectuosas.

En la hipótesis del «estrés mecánico», se cree que las mutaciones en el complejo láminas-emerina debilitan la integridad estructural de una red citoesquelética integrada. En todas las células, la lámina, la membrana nuclear interna y el complejo del poro nuclear están estrechamente relacionados. Esta hipótesis, que funciona mejor para las distrofias musculares, sugiere que a través de filamentos adheridos al complejo del poro nuclear, la lámina podría conectarse indirectamente con el citoesqueleto de la célula muscular.

Prevención y tratamiento

El descubrimiento de que las mutaciones en proteínas frecuentemente expresadas del complejo de la lámina nuclear causan diferentes enfermedades hereditarias específicas de tejido, ha sido una sorpresa y ha modificado la forma en que los científicos consideran a la envuelta nuclear. Se requiere más investigación para conocer si la base de las patologías de cada una de estas enfermedades es la regulación mecánica o la expresión génica. Sin embargo, la naturaleza molecular conocida de las enfermedades simplifica enormemente su diagnóstico y hace que su tratamiento sea más probable. El desarrollo reciente de un modelo de ratón en el que el gen *LMNA* está anulado representa un primer paso. A medida que se desarrollan los embriones, muestran síntomas de la distrofia muscular de Emery-Dreifuss.

Finalmente, los investigadores son actualmente conscientes de que varias enfermedades congénitas de desarrollo lento pueden ser nuevos miembros de las «laminopatías» nucleares.

Referencias

De Sandre-Giovannoli, A., M. Chaouch, S. Kozlov, J. M. Vallat, M. Tazir, N. Kassouri, P. Szepetowski, T. Hammadouche, A. Vandenberghe, C. L. Stewart, D. Grid and N. Levy. 2002. Homozygous defects in *LMNA*, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 726–736.

Gruenbaum, Y., A. Margalit, R. D. Goldman, D. K. Shumaker and K. L. Wilson. 2005. The nuclear lamina comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 21–31.

lámina nuclear está compuesta de proteínas fibrosas de 60 a 80 kilodalton (kd) denominadas **lamininas** junto a algunas proteínas asociadas. Las células vegetales poseen una red fibrosa similar integrada por proteínas no relacionadas. Las lamininas son un tipo de proteínas de los filamentos intermedios; las otras clases se encuentran en el cictoesqueleto (véase Cap. 12). Las células de mamíferos poseen tres genes de laminina, denominados A, B y C, que codifican al menos siete proteínas diferentes. Al igual que las otras proteínas de los filamentos intermedios, las láminas se ensamblan entre ellas para formar filamentos (Fig. 9.4), aunque el grado y la polaridad de esta

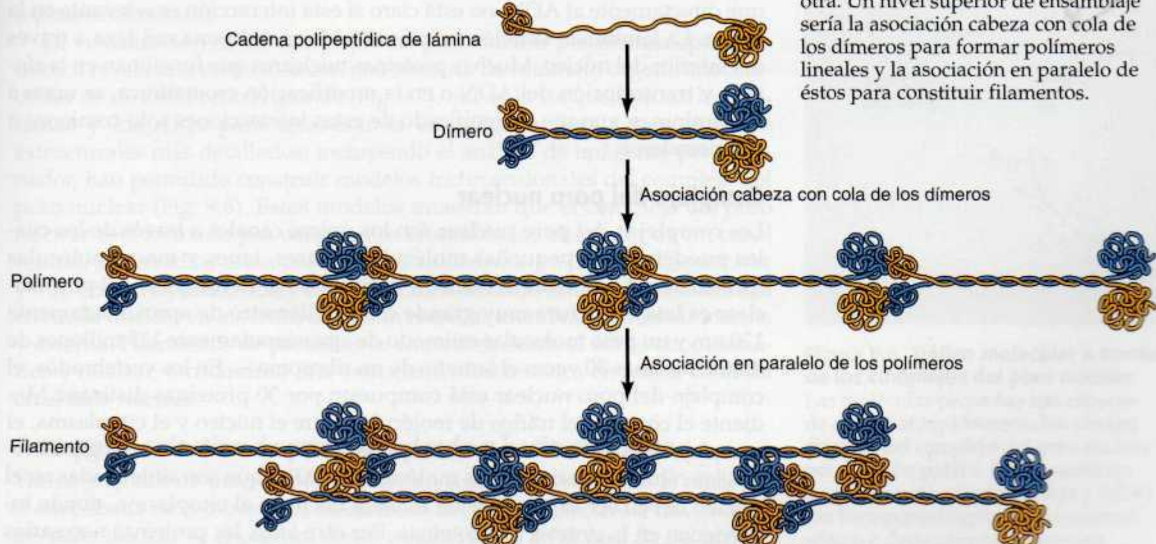
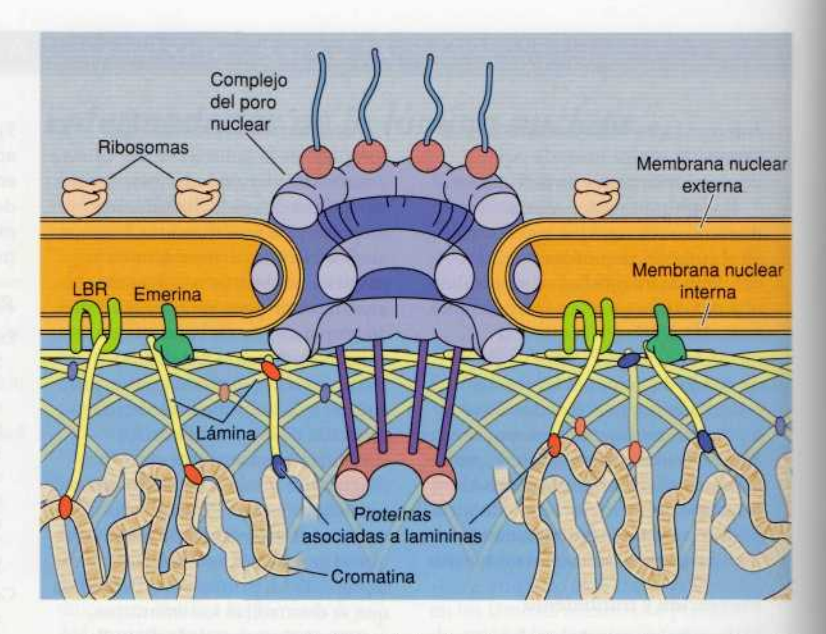


Figura 9.4 Modelo de ensamblaje de las láminas. Las láminas forman dímeros en los que las regiones centrales en α-hélice de dos cadenas polipeptídicas se enrollan una sobre otra. Un nivel superior de ensamblaje sería la asociación cabeza con cola de los dímeros para formar polímeros lineales y la asociación en paralelo de éstos para constituir filamentos.

Figura 9.5 La lámina nuclear. La membrana nuclear interna contiene varias proteínas integrales, como la emerina y el receptor de laminina B (LBR) que interaccionan con las lamininas nucleares. Las lamininas y proteínas asociadas a lamininas también interaccionan con la cromatina.



asociación se cree que es distinta de la de otros filamentos intermedios. El primer nivel de asociación es la interacción entre dos láminas para formar un dímero en el que las zonas α-hélice de dos polipéptidos están enrolladas una alrededor de otra en una estructura llamada «bobina o espiral enrollada» (*coiled coil*). Los dímeros se asocian entre sí dando lugar a los filamentos que constituyen la lámina nuclear.

La asociación entre las láminas y la membrana nuclear interna está facilitada por la adición postraduccional de lípidos —en particular, la prenilación de los residuos de cisteína carboxilo terminales (véase Fig. 8.34)—. Además, las láminas interaccionan con proteínas de la membrana nuclear interna, como la emerina y el receptor de laminina B, mediando su unión a la envuelta nuclear y localizando y organizándolas en el interior nuclear (Fig. 9.5). La lámina nuclear también se une a la cromatina a través de las histonas H2A y H2B además de a otras proteínas cromatínicas. Mientras se une directamente al ADN, no está claro si esta interacción es relevante en la célula. La lamininas también se extienden formando una red laxa a través del interior del núcleo. Muchas proteínas nucleares que funcionan en la síntesis y transcripción del ADN o en la modificación cromatínica, se unen a las lamininas, aunque el significado de estas interacciones sólo comienza a comprenderse.

Complejo del poro nuclear

Los **complejos del poro nuclear** son los únicos canales a través de los cuales pueden viajar pequeñas moléculas polares, iones y macromoléculas (proteínas y ARN) entre el núcleo y el citoplasma. El complejo del poro nuclear es una estructura muy grande con un diámetro de aproximadamente 120 nm y un peso molecular estimado de aproximadamente 125 millones de daltons —unas 30 veces el tamaño de un ribosoma—. En los vertebrados, el complejo del poro nuclear está compuesto por 30 proteínas distintas. Mediante el control del tráfico de moléculas entre el núcleo y el citoplasma, el complejo del poro nuclear tiene un papel fundamental en la fisiología de todas las células eucariotas. Las moléculas de ARN que son sintetizadas en el núcleo deben ser exportadas de manera eficiente al citoplasma, donde intervienen en la síntesis de proteínas. Por otro lado, las proteínas necesarias

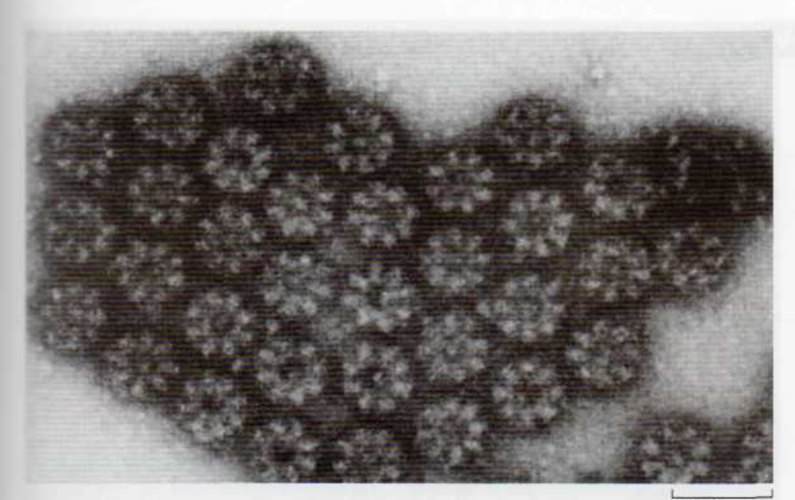


Figura 9.7 Micrografía electrónica de los complejos del poro nuclear. En esta vista frontal, los complejos del poro nuclear parecen estar constituidos por ocho subunidades estructurales alrededor de un canal central. (Cortesía del Dr. Ron Milligan, The Scripps Research Institute.)

para las funciones nucleares (p. ej., factores de transcripción) deben entrar en el núcleo procedentes de los lugares de síntesis en el citoplasma. Además, muchas proteínas sufren un trasiego continuo entre el núcleo y el citoplasma.

Dependiendo de su tamaño, las moléculas pueden pasar a través del complejo del poro nuclear mediante uno de dos mecanismos diferentes (Fig. 9.6). Las moléculas pequeñas y algunas proteínas con un peso molecular inferior a 20-40 kDa pasan libremente a través de la envuelta nuclear en ambas direcciones: del citoplasma al núcleo o del núcleo al citoplasma indistintamente. Estas moléculas difunden de manera pasiva a través de los canales acuosos abiertos, los cuales tienen un diámetro estimado de aproximadamente 9 nm, en el interior del complejo del poro nuclear. La mayoría de las proteínas y ARN, sin embargo, no son capaces de pasar por estos canales abiertos. Estas macromoléculas atraviesan el poro central de unos 10-40 nm del complejo del poro nuclear mediante un proceso activo, en el que las proteínas y los ARN adecuados son reconocidos y transportados selectivamente en una dirección específica (del núcleo al citoplasma o del citoplasma al núcleo).

La visualización de los complejos del poro nuclear por microscopia electrónica revela una estructura con una simetría de octámero organizada alrededor de un canal central grande (Fig. 9.7), que es la vía que utilizan las proteínas y los ARN para atravesar la envuelta nuclear. Otros estudios estructurales más detallados, incluyendo el análisis de imágenes por ordenador, han permitido construir modelos tridimensionales del complejo del poro nuclear (Fig. 9.8). Estos modelos muestran que el complejo del poro nuclear está formado por ocho radios ensamblados alrededor de un canal central. Estos radios están unidos a dos anillos, uno en la superficie nuclear y otro en la citoplasmática, y esta estructura de radio-anillo está anclada a la envuelta nuclear en los sitios de fusión entre las membranas nuclear interna y externa. Filamentos de proteínas se extienden desde el anillo citoplasmático y nuclear, formándose una estructura característica en forma de cesta en el lado nuclear.

Transporte selectivo de proteínas desde y hacia el núcleo

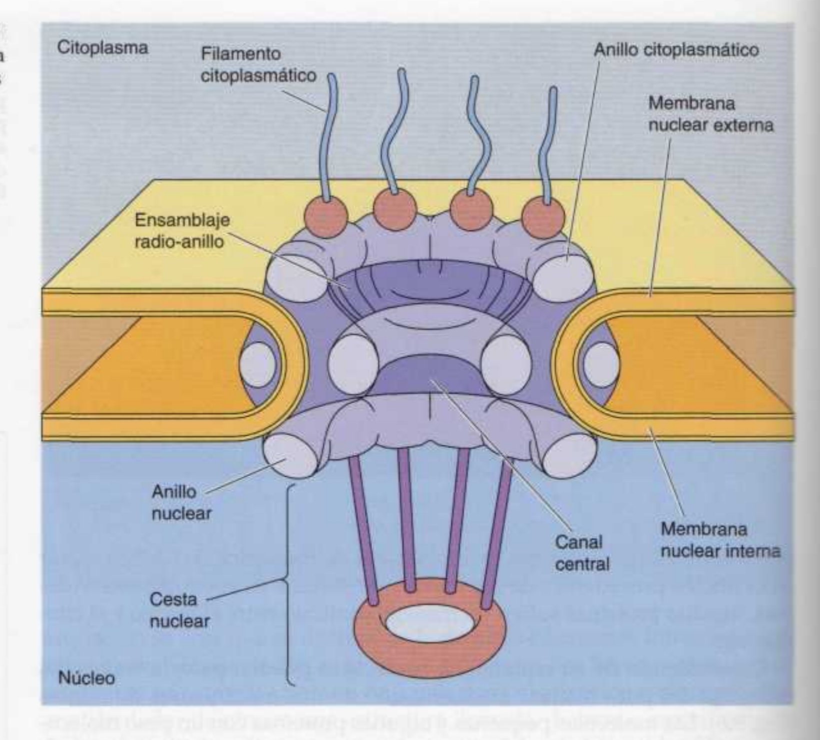
Varios millones de macromoléculas pasan selectivamente entre el núcleo y el citoplasma cada minuto. El mecanismo del tráfico selectivo a través de la envuelta nuclear se encuentra mejor caracterizado en el caso de las proteí-

■ Muchos virus deben conseguir penetrar en el núcleo para replicarse. Siguiendo la infección de una célula, los retrovirus, como el VIH, transcriben inversamente su ARN genómico para sintetizar un provirus de ADN en el citoplasma. El VIH ha desarrollado mecanismos especiales para transportar el ADN proviral al núcleo donde puede ser transcrito.

Difusión pasiva
Transporte dependiente de energía
Proteínas
Núcleo
Moléculas pequeñas
E
E
ARN

Figura 9.6 Tráfico molecular a través de los complejos del poro nuclear. Las moléculas pequeñas son capaces de atravesar rápidamente los canales abiertos del complejo del poro nuclear por difusión pasiva. Por el contrario, las macromoléculas (proteínas y ARN) son transportadas por un mecanismo selectivo dependientes de energía.

Figura 9.8 Modelo del complejo del poro nuclear. El complejo se organiza en ocho radios unidos a sendos anillos en la cara citoplasmática y nuclear de la envuelta nuclear. Toda la estructura radio-anillo se ensambla alrededor de un canal central. Los filamentos citoplasmáticos se extienden desde el anillo citoplasmático, y los filamentos que forman la estructura en forma de cesta se extienden desde el anillo nuclear.





EXPERIMENTO CLAVE

Identificación de las señales de localización nuclear

Corta secuencia de aminoácidos capaz de especificar la localización nuclear

Daniel Kalderon, Bruce L. Roberts, William D. Richardson y Alan E. Smith
National Institute for Medical Research, Mill Hill,
London Cell, Volumen 39, 1984, págs. 499-509



Alan Smith

Contexto

El mantenimiento del núcleo como un compartimento bioquímicamente distinto, requiere un mecanismo que permita segregar las proteínas entre el *núcleo y el citoplasma.* Los estudios realizados en la década de los 70 constataron que las moléculas pequeñas difundían rápidamente a través de la envuelta nuclear, pero que la mayoría de las proteínas no podían hacerlo. Por esta razón, parecía que las proteínas nucleares eran reconocidas de manera específica e importadas selectivamente al núcleo, desde su lugar de síntesis en los ribosomas citoplasmáticos.

Los experimentos anteriores realizados por Günter Blobel y colaboradores demostraron que las proteínas son etiquetadas para dirigirse al retículo endoplásmico por secuencias señal constituidas por un grupo corto de aminoácidos (véase Cap. 10). En este artículo de 1984, Alan Smith y colaboradores extendieron este principio para el etiquetado de las proteínas destinadas al núcleo, identificando una secuencia corta de aminoácidos que actúa como una señal de localización nuclear.

Experimentos

Se utilizó el antígeno T del virus SV40 como la proteína modelo para los estudios de localización nuclear en células animales. El antígeno T es una proteína de 94 kDa necesaria para la replicación del ADN del SV40, y normalmente se localiza en el núcleo de las células infectadas por este virus. Experimentos anteriores realizados en el laboratorio de Alan Smith y en el de Janet Butel (Lanford

EXPERIMENTO CLAVE

and Butel, 1984, *Cell* 37: 801-813), demostraron que la mutación de la Lys-128 siendo sustituida por treonina o asparragina impedía la acumulación del antígeno T en el núcleo, tanto en células de ratón como de mono. En vez de transportarse al núcleo, estos antígenos T mutados permanecían en el citoplasma, lo que sugería que la Lys-128 formaba parte de una señal de localización nuclear. Smith y colaboradores comprobaron esta hipótesis usando dos aproximaciones experimentales distintas.

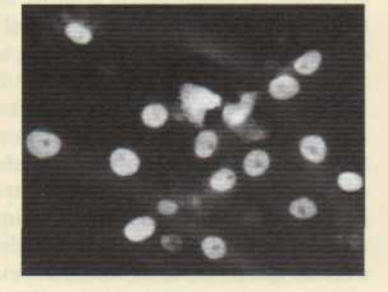
Primero, determinaron los efectos de varias deleciones sobre la localización subcelular del antígeno T. Se observó que los antígenos T mutados, con deleciones de las regiones de la cadena peptídica comprendidas entre los residuos de aminoácidos 1-126 o entre el residuo 136 y el extremo carboxilo terminal, se acumulaban normalmente en el núcleo. Por el contrario, las deleciones que afectaban desde el aminoácido 127 al 132, provocan la retención de los antígenos T en el citoplasma. Así, parecía que la secuencia de aminoácidos entre el residuo 127 y el 132 era la responsable de la localización nuclear del antígeno T.

Para determinar si esta secuencia de aminoácidos era capaz de dirigir otras proteínas al núcleo, los investigadores crearon quimeras en las cuales la secuencia de aminoácidos del antígeno T se fusionó con proteínas que normalmente se localizaban en el citoplasma. Estos experimentos demostraron que la adición de los aminoácidos 126 a 132 del antígeno T a la β-galactosidasa o a la piruvato quinasa era suficiente para provocar la acumulación de estas proteínas citoplasmáticas en el núcleo de la célula (véase figura). Por tanto, esta corta secuencia de aminoácidos del antígeno T del SV40 actúa como una señal de localización nuclear, que es suficiente y necesaria para etiquetar las proteínas de tal manera que sean transportadas al interior del núcleo.

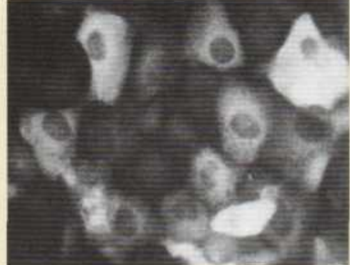
Impacto

Como Smith y sus colaboradores sugirieron en su artículo de 1984, la señal de localización nuclear del antígeno T del SV40 ha resultado «ser un prototipo de secuencias similares en otras proteínas nucleares». Mediante el marcaje de las proteínas para su transporte al núcleo, estas señales son fundamentales para establecer la identidad bioquímica del núcleo y mantener la división de las células eucariotas en dos compartimentos: núcleo y citoplasma. En la actualidad se sabe que las señales de localización nuclear son reconocidas por receptores citoplasmáticos que transportan a sus proteínas sustrato al complejo del poro nuclear. Aunque los mecanismos de transporte a través del complejo del poro nuclear todavía no se han clarificado, la identificación de las señales de localización nuclear fue un avance fundamental para comprender el transporte de proteínas al núcleo.

(A)



(B)



Las células fueron microinyectadas con ADN de plásmidos que codificaban proteínas quiméricas en las que los aminoácidos del antígeno T de SV40 se habían fusionado a la piruvato quinasa. La localización celular de las proteínas de fusión se determinó por microscopia de fluorescencia. (A) La proteína de fusión contiene una señal de localización nuclear de SV40 intacta (aminoácidos 126 a 132). (B) La señal de localización nuclear se ha inactivado por la deleción de los aminoácidos 131 y 132.

nas que son importadas desde el citoplasma al núcleo. Estas proteínas son las responsables de todas las características de la estructura y de la función del genoma; incluyen las histonas, las ADN polimerasas, las ARN polimerasas, factores de transcripción, factores de *splicing* y muchas otras. Estas proteínas se etiquetan para ser destinadas al núcleo con secuencias de aminoácidos específicas, denominadas **señales de localización nuclear**, que son reconocidas por los receptores de transporte nuclear y dirigen la translocación de proteínas a través del complejo del poro nuclear.

Alan Smith y colaboradores, en 1984, caracterizaron en detalle la primera señal de localización nuclear. Estos investigadores estudiaron el antígeno T del virus de simio SV40, una proteína codificada por el virus que inicia la replicación del ADN viral en las células infectadas (véase Cap. 6). Como era de esperar en una proteína que interviene en la replicación, el antígeno T se

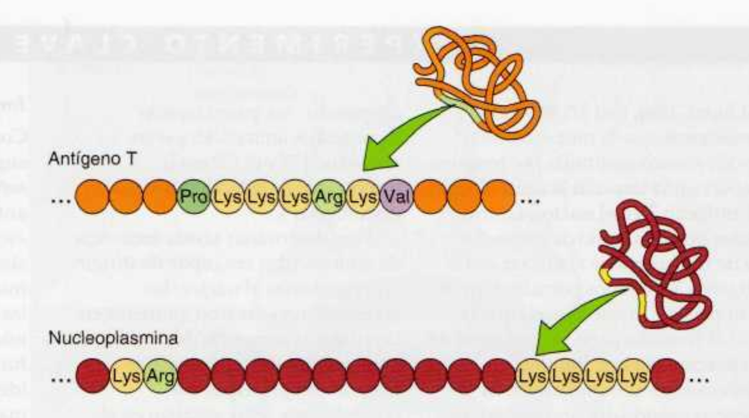


Figura 9.9 Señales de localización nuclear. La señal de localización nuclear del antígeno T es una corta secuencia de aminoácidos. Por el contrario, la señal de localización nuclear de la nucleoplasmina es una secuencia bipartita, formada por una secuencia Lys-Arg separada por diez aminoácidos de otra secuencia Lys-Lys-Lys-Lys.

suele localizar en el núcleo. La señal responsable para su localización nuclear se identificó al encontrarse que una mutación en un único residuo de lisina impide que el antígeno T se transporte al núcleo, lo que da lugar a su acumulación en el citoplasma de la célula infectada. Estudios posteriores caracterizaron la señal de localización nuclear del antígeno T como una secuencia formada por siete aminoácidos: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val. Esta secuencia no sólo era necesaria para el transporte nuclear del antígeno T, sino que al añadirse a otras proteínas, normalmente citoplasmáticas, causaba su acumulación en el núcleo.

Desde entonces se han identificado señales de localización nuclear en muchas otras proteínas. La mayoría de estas secuencias, como la del antígeno T, son cortas y ricas en aminoácidos básicos (lisina y arginina). En muchos otros casos, sin embargo, los aminoácidos que forman la señal de localización nuclear están juntos pero no necesariamente contiguos en la secuencia. Por ejemplo, la señal de localización nuclear de la nucleoplasmina (una proteína que participa en el ensamblaje de la cromatina) consta de dos partes: una secuencia Lys-Arg separada por diez aminoácidos de otra secuencia de cuatro lisinas (Fig. 9.9). Tanto las secuencias Lys-Arg como Lys-Lys-Lys-Lys son necesarias para el transporte nuclear, pero los diez aminoácidos entre estas secuencias pueden sufrir mutaciones sin afectar al transporte nuclear. Debido a que esta secuencia de localización nuclear está compuesta por dos elementos separados, se denomina secuencia bipartita. Parece ser que motivos bipartitos similares actúan como señales de localización en muchas otras proteínas nucleares, e incluso puede que sean más frecuentes que la señal de localización nuclear sencilla del antígeno T. Mientras que muchas señales de localización nuclear consisten en estos residuos aminoacídicos básicos, a menudo denominado señal de localización nuclear básica o «clásica», las secuencias aminoacídicas y estructuras de otras señales de localización nuclear varían considerablemente. Algunas son muy distantes en la secuencia de aminoácidos y dependen del correcto plegamiento de la proteína para su actividad.

Los receptores de transporte nuclear conocidos como **importinas** (debido a su actividad transportadora de proteínas al núcleo) reconocen las señales de localización nuclear. El movimiento de macromoléculas a través del poro nuclear se controla por una proteína denominada **Ran**. Ran representa una de las diversas clases de proteínas de bajo peso molecular que se unen a GPT cuya conformación y actividad están reguladas por la unión y la hidrólisis de GTP. Otros ejemplos serían Ras (véase Fig. 8.38), varios factores de transcripción que participan en la síntesis de proteínas (véase Fig. 8.13), Arf y Rab (descritos en el Cap. 10), y Rac, Rho y Cdc42 (véase Cap. 15). En el caso de Ran, las enzimas que estimulan la hidrólisis de GTP a GDP se lo-

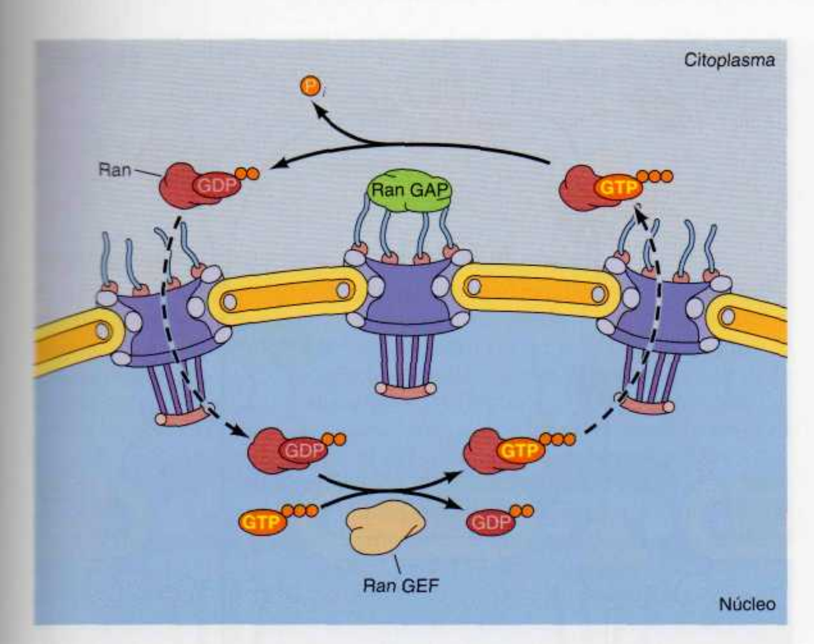


Figura 9.10 Distribución de Ran/GTP a través de la envuelta nuclear. Una distribución desigual de Ran/GTP a través de la envuelta nuclear se mantiene mediante la localización de la proteína activadora de la Ran-GTPasa (Ran GAP) en el citoplasma y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Ran (Ran GEF) en el núcleo. En el citoplasma, RanGAP (que se encuentra unida a los filamentos citoplásmicos del complejo del poro nuclear) estimula la hidrólisis del GTP unido a Ran, dando lugar a la conversión de Ran/GTP en Ran/GDP. En el núcleo, RanGEF estimula el intercambio del GDP unido a Ran por GTP, dando lugar a la conversión de Ran/GDP en Ran/GTP. Como consecuencia, se mantiene una elevada concentración de Ran/GTP en el núcleo.

calizan en la cara citoplasmática de la envuelta nuclear, mientras que las enzimas que estimulan el intercambio de GDP por GTP lo hacen en la cara nuclear (Fig. 9.10). Por tanto, la distribución de Ran/GTP en el poro nuclear es desigual y en el compartimento nuclear existe una concentración alta de Ran/GTP. Esta elevada concentración de Ran/GTP en el núcleo determina la direccionalidad del transporte nuclear de las proteínas de transporte.

Ran regula el movimiento a través del poro nuclear controlando la actividad de los receptores de transporte nuclear. El importe de proteínas a través del complejo del poro nuclear comienza cuando una importina específica se une a la señal de localización nuclear de una proteína transportadora en el citoplasma (Fig. 9.11). Este complejo importina/proteína de transporte se une a continuación a proteínas presentes en los filamentos citoplásmicos del complejo del poro nuclear, y se produce el transporte mediante la unión secuencial a proteínas específicas del poro nuclear, localizadas cada vez más cerca de la cara nuclear del complejo del poro. En este proceso destacan las proteínas de nucleoporina portadoras de numerosas repeticiones Phe-Gly, conocidas como proteínas FG, que revisten el canal central. En la cara nuclear del complejo del poro, el complejo de proteínas de transporte/importina se separa por la unión de Ran/GTP. Esto produce un cambio conformacional en la importina, que desplaza a la proteína de transporte y la libera en el núcleo.

El complejo importina-Ran/GTP se exporta a continuación a través del complejo del poro nuclear. En el citoplasma el GTP es hidrolizado a GDP. Esto libera a la importina de modo que puede unirse a una nueva proteína transportadora en el citoplasma y volver a ser transportada al interior nuclear por su propio receptor de importe (una proteína denominada NTF2), donde el Ran/GTP es regenerado.

Algunas proteínas permanecen en el interior del núcleo una vez transportadas desde el citoplasma, pero muchas otras viajan continuamente entre el núcleo y el citoplasma. Algunas de estas proteínas actúan como transportadores (*carriers*) de otras moléculas, como los ARN; otras coordinan las funciones nucleares y citoplasmáticas (p. ej., regulando la actividad de los factores de transcripción). Las proteínas se etiquetan para ser exportadas

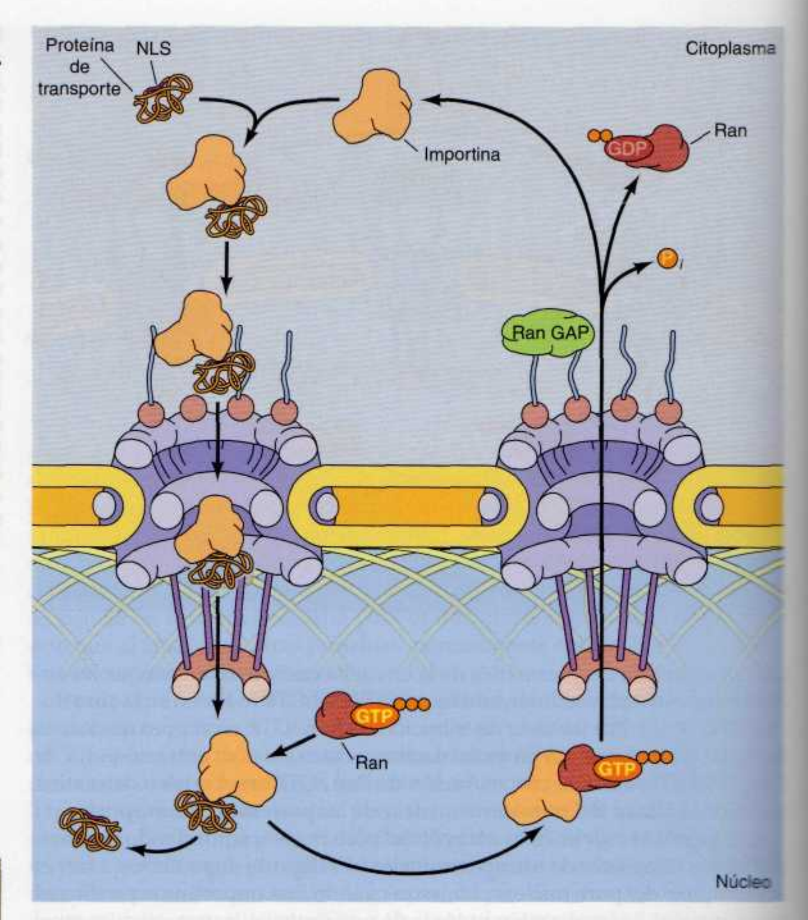


Figura 9.11 Importe de proteínas a través del complejo del poro nuclear. El transporte de una proteína a través del complejo del poro nuclear comienza cuando su secuencia de localización nuclear (NLS) es reconocida por un receptor de transporte de importina nuclear. El complejo mercancía (la proteína con la secuencia de localización nuclear) / importina se une a las proteínas específicas del poro nuclear en sus filamentos citoplásmicos. Mediante unión secuencial a proteínas del poro nuclear más interiores, el complejo es translocado a través del poro nuclear. En el lado nuclear del poro, el complejo mercancía/importina se rompe como consecuencia de la unión de Ran/GTP a la importina. El cambio de conformación de la importina desplaza la proteína mercancía y lo libera en el núcleo. El complejo importina-Ran/GTP se reexporta a través del poro nuclear y la proteína activadora de GTPasa (Ran-GAP) presente en el citoplasma hidroliza el GTP de Ran en GDP, liberando la importina.



9.1 Animación web

Importación y exportación de proteínas a través del complejo del poro nuclear

Las proteínas se dirigen hacia el núcleo o salen de él a través de señales de localización nuclear o señales de exportación nuclear, respectivamente, que hacen posible su reconocimiento por receptores que dirigen su transporte a través del complejo del poro nuclear.

del núcleo mediante una secuencia de aminoácidos específica, llamada **señal de exportación nuclear**. Al igual que las señales de localización nuclear, las señales de exportación nuclear son reconocidas por receptores en el interior del núcleo **exportinas,** que dirigen el transporte de las proteínas a través del complejo del poro nuclear al citoplasma. Al igual que las importinas, muchas exportinas pertenecen a una familia de receptores de transporte nuclear denominados **carioferinas** (Tabla 9.1).

Las exportinas se unen a Ran, necesaria tanto para la exportación nuclear como la importación nuclear (Fig. 9.12). Sorprendentemente, sin embargo, Ran/GTP promueve la formación de complejos estables entre las exportinas y las proteínas diana, mientras que disocia los complejos entre las importinas y sus proteínas diana. Este efecto de la unión de Ran/GTP sobre las exportinas dirige el movimiento de las proteínas con señales de exportación nuclear desde el núcleo al citoplasma. Por tanto, las exportinas forman complejos estables con sus proteínas diana y con Ran/GTP en el interior del núcleo. Una vez que se ha producido el transporte al lado citosólico de la envuelta nuclear, la hidrólisis de GTP y la liberación de Ran/GDP provoca la disociación de la proteína diana, que es liberada en el citoplasma. Las exportinas se reciclan a través del complejo del poro nuclear para su reutilización. El mecanismo importina-exportina-Ran/GTP también funciona en las células vegetales, aunque no se conoce con detalle.

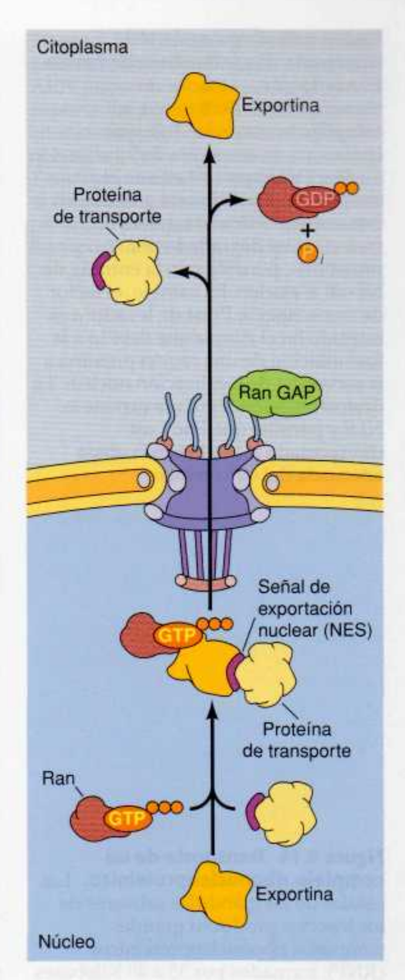


Figura 9.12 Exportación nuclear. En el núcleo se forman los complejos entre las proteínas diana que contienen señales de exportación nuclear (NES), las exportinas y Ran/GTP. Tras el transporte a través del complejo del poro nuclear, Ran GAP induce la hidrólisis del GTP unido, dando lugar a Ran/GDP y a la liberación de la proteína diana y de la exportina en el citoplasma.

Regulación del transporte de proteínas al núcleo

El transporte de proteínas al núcleo es un nuevo nivel en el que las actividades de las proteínas nucleares pueden ser controladas. Los factores de transcripción sólo son funcionales cuando están presentes en el núcleo, por lo que la regulación de su transporte al núcleo es otra forma de control de la expresión génica. Como se discutirá en el Capítulo 15, el transporte regulado al núcleo de los factores de transcripción y de las proteína quinasas tiene un papel importante en el control del comportamiento de las células a través de un mecanismo de transmisión de señales recibidas en la supervivencia celular hacia el núcleo. La importancia de la regulación del importe nuclear se demuestra con el descubrimiento de que variaciones en la afinidad del receptor de transporte nuclear de tan solo dos proteínas del complejo del poro nuclear, aparentemente contribuyeron a la divergencia evolutiva entre *Drosophila melanogaster* y *Drosophila simulans*.

En uno de los mecanismos de regulación, los factores de transcripción (u otras proteínas) se asocian con proteínas citoplasmáticas que enmascaran las señales de localización nuclear; puesto que ya no se reconocen estas señales, las proteínas permanecen en el citoplasma. Un buen ejemplo lo aporta el factor de transcripción NF-κB, que se activa en respuesta a una variedad de señales extracelulares en las células de mamíferos (Fig. 9.13). En células no estimuladas, NF-κB se encuentra formando un complejo inactivo con una proteína inhibidora (IκB) en el citoplasma. La unión a I-κB parece enmascarar la señal de localización nuclear de NF-κB, y se impide su transporte al núcleo. En las células estimuladas, IκB se fosforila y degrada por proteólisis mediada (véase Fig. 8.43), por ubiquitinas, lo que permite que NF-κB entre al interior del núcleo y active la transcripción de sus genes diana.

El transporte al interior del núcleo de otros factores de transcripción está regulado directamente por su fosforilación, más que por la asociación con proteínas inhibidoras (véase Fig. 9.13). Por ejemplo, el factor de transcripción de levaduras Pho4 se fosforila en un residuo de serina adyacente a su señal de localización nuclear. La fosforilación en este punto inhibe que Pho4

Tabla 9.1 Carioferinas con sustratos conocidos

Carioferina	Sustratos
Importe	
Dímero Kapα/Kapβ 1	Proteínas con una señal de localización nuclear de aminoácidos básica (p. ej., nucleoplasmina)
Esnurportina/Kapβ 1	RNPsn (U1, U2, U4, U5)
Kapβ 1 alone	Complejos Cdk/ciclina
Kapβ 2 (transportina)	Proteínas de unión a ARNm, proteínas ribosómicas
Importina7/dímero Kapβ 1	Histona H1, proteínas ribosómicas
Exporte	
Crm1	Proteínas con una señal de exportación rica en leucina, esnurportina, ARNsn
CAS	Kapα
Exportina-t	ARNt
Exportina-4	Factor de elongación 5A

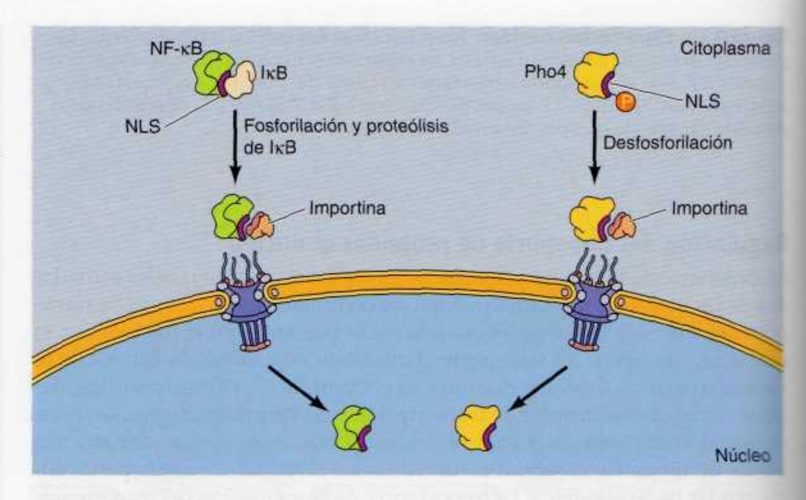


Figura 9.13 Regulación del transporte al núcleo de factores de transcripción. El factor de transcripción NF-κB forma un complejo inactivo con IκB, que enmascara su secuencia de localización nuclear (NLS) y se retiene en el citoplasma. En respuesta a una señal extracelular adecuada, IκB es fosforilado y degradado por proteólisis, permitiendo la entrada de NF-κB al núcleo. En cambio, el factor de transcripción Pho4 de levadura es retenido en el citoplasma debido a la fosforilación de una región próxima a la secuencia de localización nuclear. La desfosforilación regulada expone la NLS y permite que Pho4 sea transportado al núcleo en la etapa adecuada del ciclo celular.

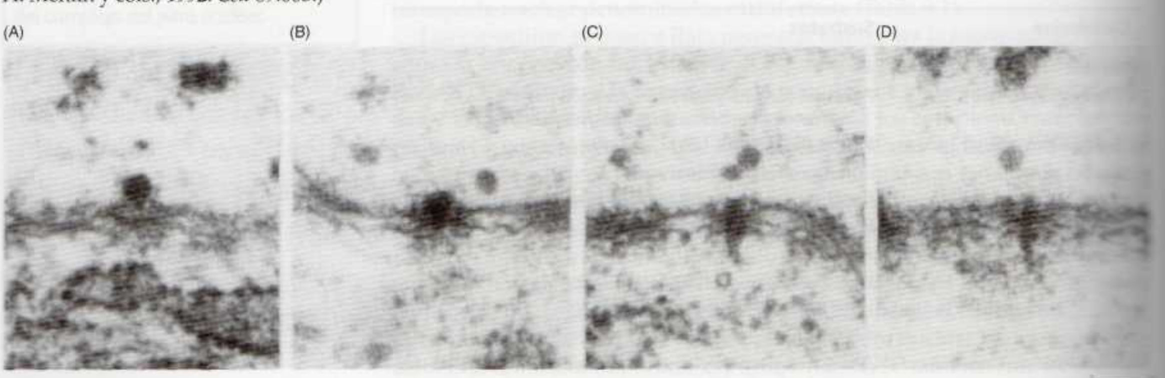
interfiera con su importe nuclear. Bajo las condiciones apropiadas, la defosforilación regulada de este punto activa a Pho4 permitiendo su translocación al núcleo.

Transporte de ARN

Mientras que muchas proteínas son transportadas selectivamente desde el citoplasma al núcleo, la mayoría de los ARN son exportados desde el núcleo al citoplasma. Puesto que las proteínas se sintetizan en el citoplasma, la salida de los ARNm, ARNr, ARNt y microARN (ARNmi) es un proceso fundamental en la expresión génica en las células eucariotas. Al igual que la entrada de las proteínas al núcleo, la salida de los ARN a través de los complejos del poro nuclear es un proceso activo, dependiente de energía, requiriendo que los receptores de transporte interaccionen con el complejo del poro nuclear. Las importinas del tipo carioferina y las exportinas (véase Tabla 9.1) transportan la mayoría de ARNt, ARNr, ARNmi y los ARN pequeños nucleares en un modo dependiente de Ran/GTP. Sin embargo, los ARNm son exportados por un complejo de dos proteínas (el «exportador del ARNm»), una de las cuales está relacionada con el transportador Ran/GDP, NTF2. Este transporte de ARNm parece ser independiente de Ran.

Los ARN son transportados a través de la envuelta nuclear como complejos ribonucleoproteína (RNP) (Fig. 9.14). Los ARN ribosómicos se aso-

Figura 9.14 Transporte de un complejo ribonucleoproteínico. Las células de las glándulas salivares de los insectos producen grandes complejos ribonucleoproteínicos (RNP), formados por 35 a 40 Kilobases de ARN y con un peso molecular total aproximado de 30 millones de daltons. Esta serie de micrografías electrónicas muestra la unión de una RNP a un complejo del poro nuclear (A) y el despliegue del ARN durante su translocación al citoplasma (B-D). (De H. Mehlin y cols., 1992. *Cell* 69:605.)



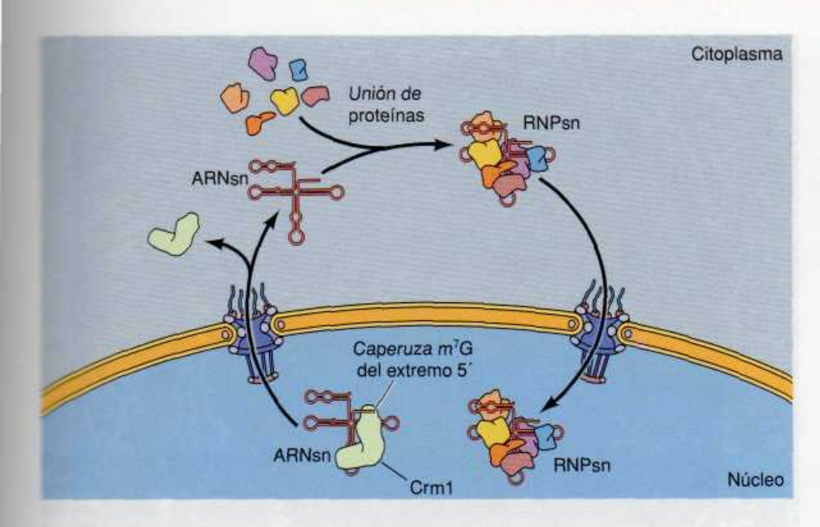


Figura 9.15 Transporte de los ARNsn entre el núcleo y el citoplasma. Los ARN pequeños nucleares son exportados primero desde el núcleo al citoplasma, por una exportina (Crm1) que reconoce la caperuza de 7-metilguanosina del extremo 5'. En el citoplasma, los ARNsn se asocian a proteínas para generar RNPsn que se transportan de nuevo al núcleo.

cian en primer lugar con proteínas ribosómicas y con proteínas específicas del procesamiento de ARN en el nucléolo, y las subunidades 60S y 40S nacientes son entonces transportadas de manera independiente al citoplasma (véase Fig. 9.31) a través de un mecanismo en el que interviene la carioferina Crm1. Su exportación del núcleo está mediada por señales de exporte nuclear presentes en las proteínas del complejo de la subunidad. Los pre-ARNm y ARNm están asociados con un conjunto de al menos 20 proteínas durante su procesamiento en el núcleo y posterior transporte al citoplasma, lo que está mediado por el complejo exportador del ARNm, después de su reclutamiento al ARNm procesado. Los ARNt precursores de ARNmi son exportados del núcleo por la acción de la exportina-t, y exportina5, respectivamente que se une directamente a los ARNt.

A diferencia de los ARNm, los ARNt y los ARNr, que funcionan en el citoplasma, muchos ARN pequeños (ARNsn y ARNsno) intervienen en el núcleo como componentes de la maquinaria del procesamiento del ARN. Estos ARN se transportan inicialmente desde el núcleo al citoplasma, donde se asocian con proteínas para formar RNPsn funcionales y entonces regresan al núcleo (Fig. 9.15). Crm1 y otras proteínas que se unen a las caperuzas de 7-metilguanosina del extremo 5' participan en la exportación de los ARNsn al compartimento citoplasmático. Mientras que las secuencias presentes en las proteínas RNPsn son las responsables del transporte de los RNPsn desde el citoplasma al núcleo.

Organización interna del núcleo

El núcleo es más que un almacén en el que la cromatina, ARN y proteínas nucleares pueden moverse libremente en una solución acuosa. Por el contrario, el núcleo parece tener una estructura interna que organiza el material genético y localiza las funciones nucleares. En las células animales una matriz laxa de laminina nucleares se extiende desde la lámina nuclear hacia el interior del núcleo. Estas lamininas sirven como puntos de unión para la cromatina y organizan otras proteínas en cuerpos nucleares. La cromatina en el interior nuclear se organiza en grandes lazos de ADN, y regiones específicas de estos lazos se encuentran unidas a la matriz de laminina mediante proteínas de unión a laminina presentes en la cromatina. Muchas otras proteínas nucleares forman complejos dependientes de laminina, y estos complejos forman cuerpos nucleares que poseen papeles en la reparación

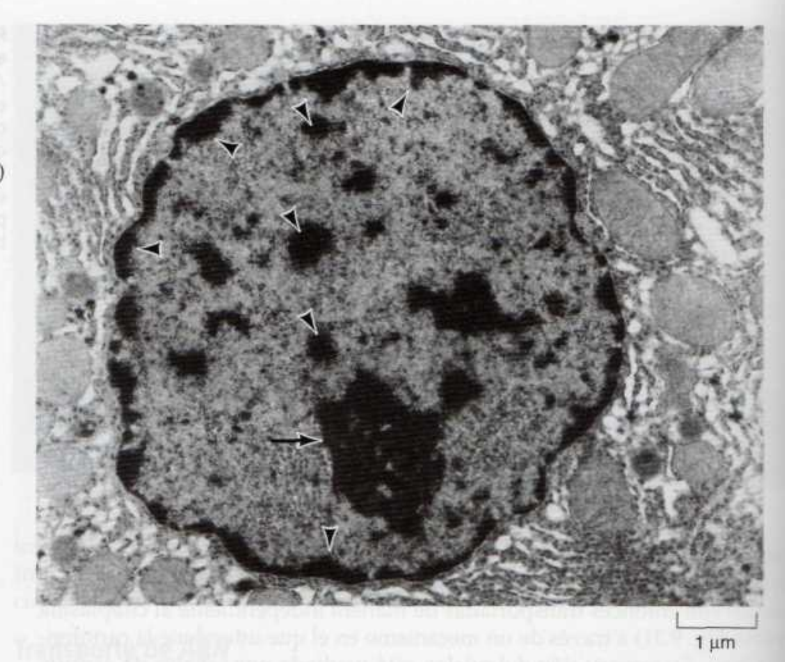


Figura 9.16 Heterocromatina en un núcleo interfásico. La eucromatina está distribuida por todo el núcleo. La heterocromatina se indica con los triángulos y el nucléolo con la flecha. (Cortesía de Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)

del ADN, la organización de la cromatina, la regulación génica y la transducción de la señal. Se cree que este papel de la lámina nuclear y las proteínas lamininas en la localización de la reparación del ADN y la transcripción génica es la base de la variedad de las enfermedades genéticas relacionadas con la laminina.

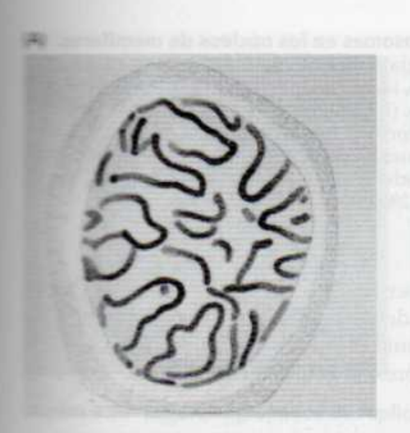
Cromosomas y estructura de orden superior de la cromatina

La cromatina se condensa durante la mitosis para formar los cromosomas compactos metafásicos que se distribuirán a los núcleos hijos (véase Fig. 5.15). Durante la interfase, una parte de la cromatina (**heterocromatina**) permanece muy condensada y es transcripcionalmente inactiva; el resto de la cromatina (**eucromatina**) está descondensada y distribuida por todo el núcleo (Fig. 9.16). Las células contienen dos tipos de heterocromatina. La heterocromatina constitutiva está formada por secuencias de ADN que nunca se transcriben, como las secuencias satélite localizadas en los centrómeros de los cromosomas. La heterocromatina facultativa contiene secuencias que no se transcriben en la célula observada, pero que sí se transcriben en otros tipos celulares. Por tanto, la cantidad de heterocromatina facultativa varía dependiendo de la actividad transcripcional de la célula.

■ **Los protozoos ciliados contienen dos tipos de núcleos: un macronúcleo poliploide que contiene los genes transcripcionalmente activos, y uno o más micronúcleos diploides transcripcionalmente inactivos que participan en la reproducción sexual.**

Aunque la cromatina interfásica parece que se distribuye uniformemente, los cromosomas realmente se disponen de manera organizada y se dividen en distintos dominios funcionales que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión génica. La distribución no aleatoria de la cromatina dentro del núcleo interfásico fue sugerida por primera vez en 1885 por Carl Rabl, que propuso que cada cromosoma ocupaba una zona concreta, con los centrómeros y los telómeros adheridos a lados opuestos de la envuelta nuclear (Fig. 9.17). Este modelo básico de organización cromosómica fue confirmado unos 100 años después (en 1984) mediante estudios detallados de los cromosomas politénicos de las glándulas salivares de *Drosophila*. En vez de localizarse al azar, enrollados unos con otros, se encontró que cada cromosoma ocupaba un lugar determinado en el interior nuclear (Fig. 9.18). Los cromosomas están íntimamente asociados a la envuelta nuclear en mu-

(B)



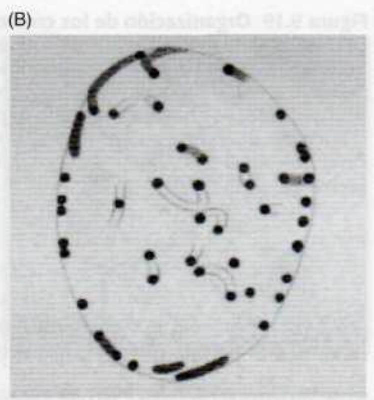


Figura 9.17 Organización cromosómica. Reproducción de unos bocetos de cromosomas en células de salamandra. (A) Cromosomas completos. (B) Sólo los telómeros (localizados en la membrana nuclear). (De C. Rabl, 1885. *Morphologisches Jahrbuch* 10: 214.)

chos puntos. Muchas de estas asociaciones dan lugar a la represión de la expresión génica, aunque algunas, como aquellas en las que intervienen complejos del poro nuclear, favorecen la transcripción de ciertos genes.

Cada uno de los cromosomas también ocupa una zona distinta en el núcleo de las células de mamífero (Fig. 9.19). Los genes que se transcriben activamente parece que se localizan en la periferia de estas zonas, próximos a unos canales que separan los cromosomas. Se cree que los ARN recién transcritos son liberados a estos canales entre los cromosomas, donde tiene lugar el procesamiento del ARN. Gran parte de la heterocromatina se localiza en la periferia del núcleo porque las proteínas asociadas con la heterocromatina se unen a la matriz de la lámina nuclear. Puesto que distintos tipos celulares expresan diferentes genes, su heterocromatina facultativa es diferente y distintas regiones de sus cromosomas interaccionan con la lámina nuclear en las diversas células y tejidos. Algunas células poseen sus centrómeros y telómeros agrupados en polos opuestos, mientras que otras poseen sus cromosomas organizados radialmente. Las localizaciones de los cromosomas en el núcleo también difieren en distintos organismos y tejidos. Por otra parte, la cromatina del compartimento nuclear se reorganiza durante el proceso de diferenciación celular de manera coordinada con los cambios de la expresión génica. Este dinámico proceso de reorganización de la cromatina es complejo y no se conoce con detalle, aunque se cree que una parte del mismo depende de la actina y la miosina nucleares –unas proteínas que se identificaron inicialmente como componentes del citoesqueleto (véase Cap. 12).

Al igual que el ADN en los cromosomas metafásicos (véase Fig. 5.16), la cromatina de los núcleos interfásicos parece que está organizada en dominios en forma de bucle que contienen de 50 a 100 Kb de ADN. Un buen ejemplo de esta organización en dominios en forma de bucle lo representan los cromosomas de oocitos de anfibios, con una alta tasa de transcripción; en es-

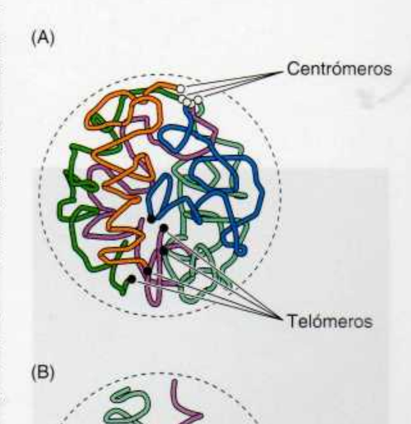
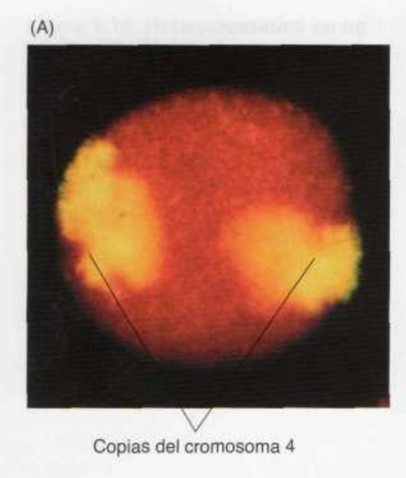


Figura 9.18 Organización de los cromosomas de *Drosophila*. (A) Un modelo del núcleo, mostrando 5 brazos cromosómicos con distintos colores. Se indica la posición de los telómeros y los centrómeros. (B) Los dos brazos del cromosoma 3 se muestran para ilustrar la separación topológica entre los cromosomas. (De D. Mathog y cols., 1984. *Nature* 308: 414.)

(A)



(B)

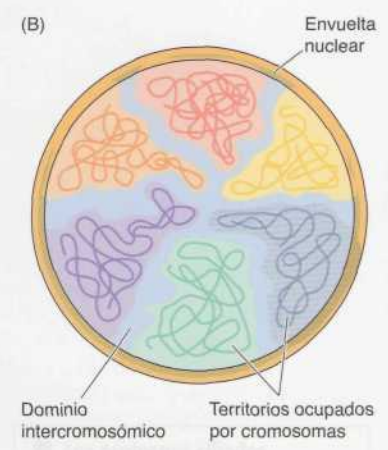


Figura 9.19 Organización de los cromosomas en los núcleos de mamíferos. (A) Hibridación de sondas dirigidas contra secuencias del cromosoma 4 en células humanas. Las dos copias del cromosoma, identificadas con fluorescencia amarilla, se localizan en zonas distintas del núcleo. (B) Un modelo de organización cromosómica. Los cromosomas ocupan zonas definidas, separadas por dominios intercromosómicos donde se cree que ocurre el procesamiento y el transporte del ARN. (A, cortesía de Thomas Cremer, Ludwig Maximilians University, de A. I. Lamond y W. C. Earnshaw, 1998. *Science* 280: 547.)

tos, las regiones de ADN que se transcriben activamente se visualizan como grandes bucles de cromatina descondensada (Fig. 9.20). Estos dominios de cromatina parece que representan unidades funcionales discretas, que de manera independiente regulan la expresión génica (véase Cap. 7).

Sub-compartimentos nucleares

La organización interna del núcleo está demostrada por la localización de otros procesos nucleares a regiones concretas del núcleo. Muchas enzimas importantes y otras proteínas del núcleo están localizadas en cuerpos subnucleares definidos que poseen una estructura de baja densidad con aspecto de esponja, que permite que las macromoléculas del resto del núcleo entren y salgan. Las secuencias de dirección o de retención para algunas de estas estructuras han sido identificadas pero todavía no han sido caracterizadas. La naturaleza y función de estas subestructuras nucleares todavía no están claras, y la comprensión de la organización del interior nuclear en dominios funcionales es un campo inexplorado de la biología celular.

Los núcleos de las células de mamífero parecen contener sitios agrupados de replicación del ADN, en los cuales tiene lugar la replicación de múltiples moléculas de ADN. Estos sitios discretos de replicación del ADN se han caracterizado mediante experimentos que permiten visualizar en el interior de los núcleos celulares tiñendo las células con bromodeoxiuridina, un análogo de la timidina que se incorpora en el ADN y después es detectado mediante su tinción con anticuerpos fluorescentes (Fig. 9.21). Al comienzo de la síntesis de ADN, el ADN recién replicado era detectado en

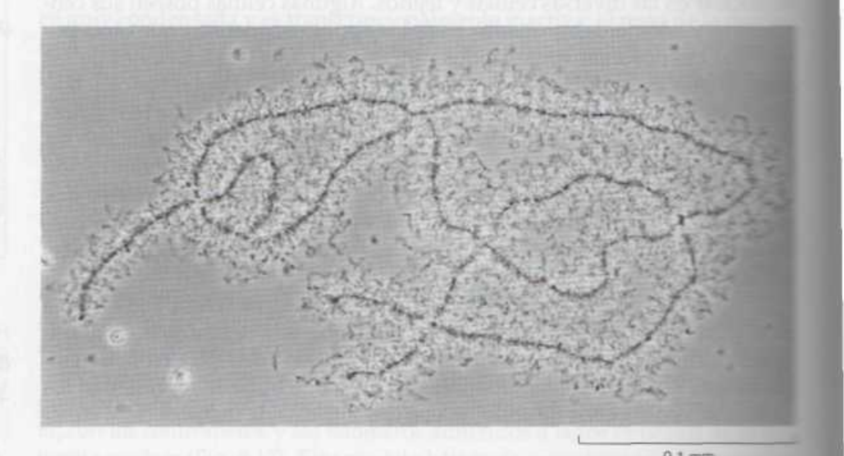


Figura 9.20 Dominios en bucle de la cromatina. Micrografía al microscopio óptico de un cromosoma de oocito de anfibio, mostrando los bucles de cromatina descondensada, que está siendo activamente transcrita, extendiéndose desde un eje de cromatina no transcrita, altamente condensada. (Cortesía de Joseph Gall, Carnegie Institute.)

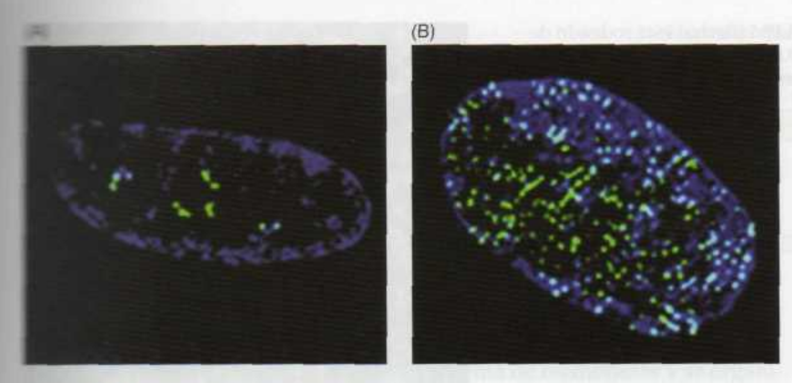


Figura 9.21 **Lugares agrupados de replicación de ADN.** El ADN recién replicado se marcó tras una exposición breve de las células a bromodeoxiuridina, que se incorpora al ADN en lugar de la timidina. Esta sustitución permite detectar el ADN recién sintetizado por inmunofluorescencia tras el marcaje de los núcleos con un anticuerpo contra bromodeoxiuridina. Obsérvese que el ADN recién replicado se localiza en agrupaciones distribuidas por todo el núcleo. Los dos paneles muestran la distribución temprano y tarde en la síntesis de ADN, respectivamente. (De B. K. Kennedy y cols. 2000. *Genes Dev.* 14: 2855).

20 grupos definidos distribuidos alrededor del nucléolo. Estos puntos perinucleolares estaban asociados con las lamininas perinucleares. Más adelante, en la síntesis de ADN el proceso se extiende a varios cientos de puntos que se encontraban distribuidos por el núcleo. Dado que una célula diploide de mamífero posee aproximadamente 4.000 orígenes de replicación activos en un momento determinado, cada una de estas agrupaciones de replicación del ADN debe contener unas 40 horquillas de replicación. Por tanto, parece ser que la replicación tiene lugar en estructuras grandes que contienen múltiples complejos de replicación organizados en distintos dominios funcionales, denominados fábricas de replicación.

Los genes que se transcriben activamente parece que se distribuyen por todo el núcleo, pero los componentes de la maquinaria de *splicing* se concentran en cuerpos nucleares discretos denominados motas nucleares. La tinción inmunofluorescente con anticuerpos frente a RNPpn y los factores de corte y empalme mostraron que, en lugar de estar distribuidos uniformemente a lo largo del núcleo, estos componentes del aparato de procesamiento de ARN están concentrados en estas 20 a 50 estructuras discretas (Fig. 9.22). Se cree que las motas son puntos de almacenamiento de componentes del procesamiento, que después son reclutados a los genes activamente transcritos donde se produce el procesamiento del pre-ARNm.

Además de las motas, los núcleos contienen otros varios tipos de estructuras distintas. Aparte de los nucléolos (estudiados más adelante), incluyen los cuerpos LPM y los cuerpos de Cajal. Los cuerpos LPM (típicamente de 5-20 en el núcleo) fueron identificados en primer lugar como sitios diferenciados de localización de una proteína reguladora transcripcional implicada en la leucemia promielocítica aguda (LPM). Se sabe que los cuerpos LPM

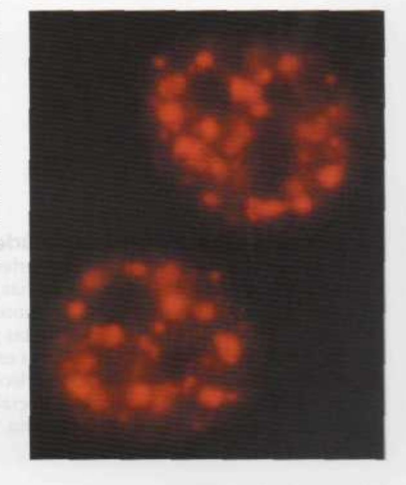


Figura 9.22 **Localización de los componentes responsables del *splicing*.** El marcaje mediante anticuerpos inmunofluorescentes indica que los factores responsables del *splicing* se concentran en dominios discretos dentro del núcleo, denominados motas nucleares. (Cortesía de David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory.)

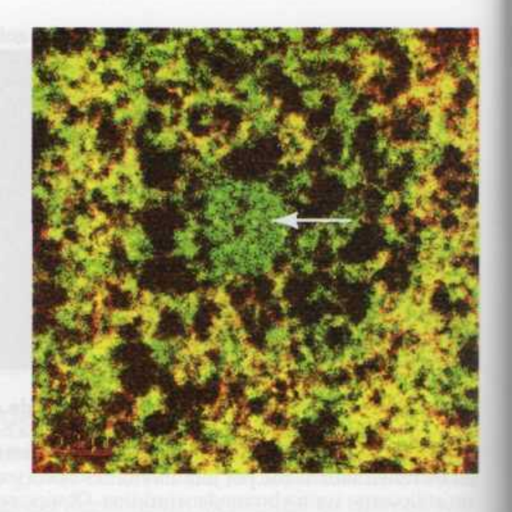


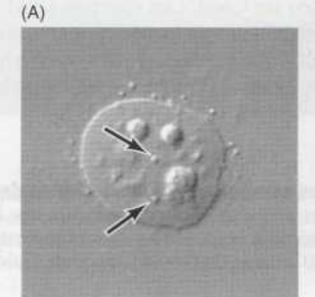
Figura 9.23 Un cuerpo LPM. El cuerpo LPM (flecha) está rodeado de cromatina. (De G. Dellaire, R. Nisman y D.P. Bazett-Jones. 2004. *Met. Enzymol.* 375: 456; cortesía de D. Bazett-Jones.)

interaccionan con la cromatina (Fig. 9.23) y son puntos de acumulación de factores de transcripción y proteínas modificadoras de la cromatina (como las histona deacetilasas), que pueden ser dirigidas a los cuerpos LPM por la acción del pequeño polipéptido SUMO (estudiado en el Cap. 8). Sin embargo, la función de los cuerpos LPM sigue siendo muy desconocida. Los cuerpos de Cajal contienen la proteína característica coilina (Fig. 9.24) y están enriquecidos en RNP pequeñas. Se cree que funcionan como sitios de ensamblaje y procesamiento de RNP.

Nucléolo y procesamiento del ARNr

La subestructura que más destaca en el núcleo es el **nucléolo** (véase Fig. 9.1), que es el sitio donde tiene lugar la transcripción y el procesamiento del ARNr, y el ensamblaje de los ribosomas. Como se explicó en el capítulo anterior, las células necesitan una gran cantidad de ribosomas para satisfacer la necesidad de síntesis de proteínas. Por ejemplo, las células de mamífero en continuo crecimiento contienen entre 5 y 10 millones de ribosomas, que deben sintetizarse cada vez que la célula se divide. El nucléolo es una fábrica de producción de ribosomas, diseñada para cubrir las necesidades de producción a gran escala de los ARNr y de ensamblaje de las subunidades ribosómicas. Evidencias recientes sugieren que los nucléolos también poseen un papel más general en la modificación del ARN y que varios tipos de ARN entran y salen del nucléolo en estadios específicos de su procesamiento.

(A)



(B)

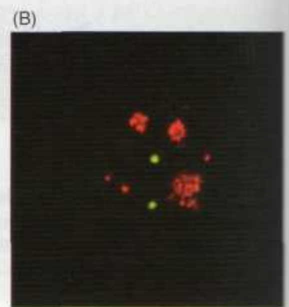


Figura 9.24 Cuerpos de Cajal en el núcleo. (A) Imagen de un microscopio de contraste por interferencia diferencial del núcleo de una célula HeLa. Las flechas indican los dos cuerpos de Cajal. (B) Tinción inmunofluorescente del mismo núcleo con anticuerpos frente a las proteínas Coilina (verde) y Fibrilarina (rojo). La fibrilarina está presente tanto en las zonas fibrilares densas de los nucléolos, como en los cuerpos de Cajal. La coilina sólo es detectable en los cuerpos de Cajal. (De J. G. Gall, 2000. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:273.)



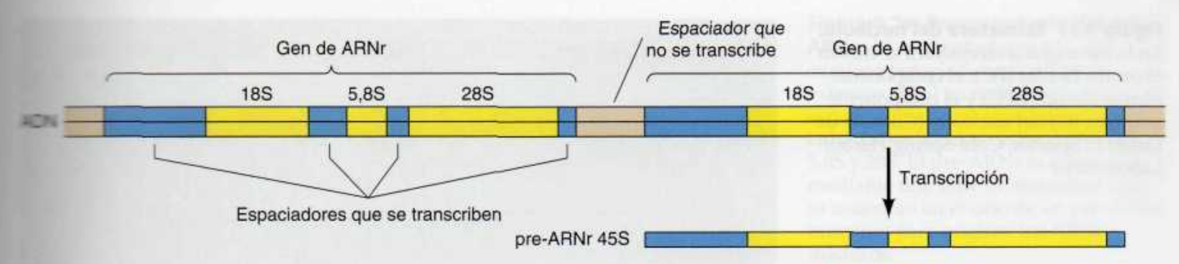


Figura 9.25 Genes de ARN ribosómico. Cada gen de ARNr es una única unidad transcripcional que contiene los ARNr 18S, 5,8S y 28S y secuencias espaciadoras que también se transcriben. Los genes de ARNr se disponen en tándem, separados por un ADN espaciador que no se transcribe.

Genes de ARN ribosómico y organización del nucléolo

El nucléolo no está rodeado por ningún sistema de membranas y se organiza alrededor de las regiones de los cromosomas que contienen los genes para los ARNr 5,8S, 18S y 28S. Los ribosomas eucariotas contienen cuatro tipos de ARN, denominados 5S, 5,8S, 18S y 28S (véase Fig. 8.4). Los ARNr 5,8S, 18S y 28S son transcritos como una única unidad en el nucléolo por la ARN polimerasa I, dando lugar a un ARN precursor ribosómico 45S (Fig. 9.25). Este pre-ARNr 45S es procesado y da lugar al ARN 18S de la subunidad ribosómica 40S (pequeña) y a los ARNr 5,8S y 28S de la subunidad ribosómica 60S (grande). El ARNr 5S, que también forma parte de la subunidad ribosómica 60S, se transcribe fuera del nucléolo por la ARN polimerasa III.

Las células contienen múltiples copias de los genes de ARNr para poder satisfacer la demanda de transcripción de un elevado número de moléculas de ARNr. El genoma humano, por ejemplo, contiene aproximadamente unas 200 copias del gen que codifica para los ARNr 5,8S, 18S y 28S, y aproximadamente 2.000 copias del gen que codifica para el ARNr 5S. Los genes del ARNr 5,8S, 18S y 28S se disponen en tándem en cinco cromosomas humanos diferentes (cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22); los genes para el ARNr 5S se localizan en una única secuencia en tándem en el cromosoma 1.

La importancia de la producción de ribosomas resulta particularmente evidente en los oocitos, en los que los genes para los ARNr están amplificados para ayudar a la síntesis de la gran cantidad de ribosomas necesarios durante el desarrollo embrionario temprano. En los oocitos de *Xenopus*, los genes para el ARNr están amplificados aproximadamente 2.000 veces, lo que permite que exitan un millón de copias por célula. Estos genes de ARNr están distribuidos entre miles de nucléolos (Fig. 9.26), originándose en total cerca de 10^{12} ribosomas por oocito.

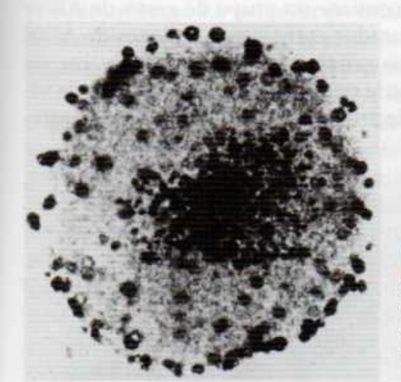


Figura 9.26 Nucléolos en oocitos de anfibio Los genes de ARNr amplificados en los oocitos de *Xenopus* se agrupan en muchos nucléolos (puntos oscuros). (De D. D. Brown e I. B. Dawid, 1969. *Science* 160: 272.)

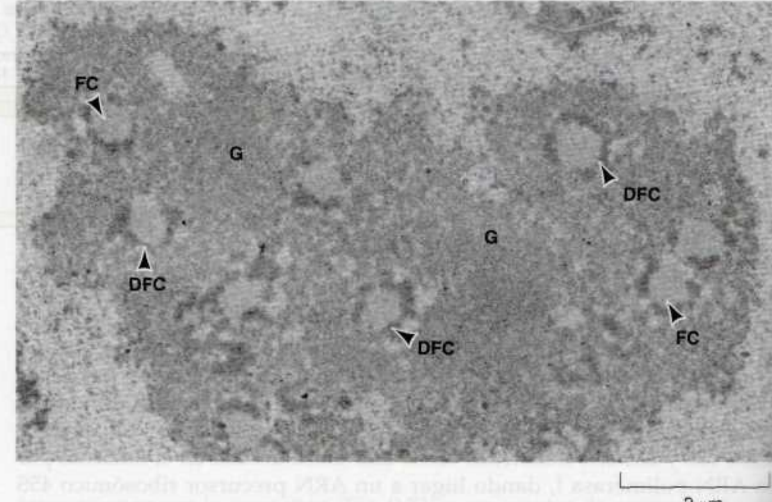


Figura 9.27 Estructura del nucléolo. En la micrografía electrónica se ilustra el centro fibrilar (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (G) del nucléolo. (Cortesía de David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory.)

Morfológicamente, los nucléolos constan de tres regiones diferenciadas: el centro fibrilar, el componente fibrilar denso y el componente granular (Fig. 9.27). Estas tres zonas posiblemente reflejan la progresión de las etapas de transcripción del ARNr, procesamiento y ensamblaje de ribosomas. La modificación de otros ARN pequeños, como el de la partícula de reconocimiento de la señal (véase Cap. 10), tiene lugar en otro lugar dentro del nucléolo.

Después de cada división celular, los nucléolos se forman alrededor de las regiones cromosómicas que contienen los genes para los ARNr 5,8S, 18S y 28S, y que por esta razón se denominan **regiones organizadoras nucleolares**. La formación de los nucléolos requiere la transcripción del pre-ARNr 45S, que parece ser que dirige la fusión de los cuerpos prenucleolares que contienen los factores implicados en el procesamiento y otros componentes del nucléolo. Por tanto, en la mayoría de las células, los nucléolos que están inicialmente separados se fusionan para formar un único nucléolo. El tamaño del nucléolo depende de la actividad metabólica de la célula, siendo los nucléolos más grandes en aquellas células con una alta actividad de síntesis de proteínas. Esta variación se debe fundamentalmente a las diferencias en el tamaño del componente granular, lo que refleja la tasa de ensamblaje de ribosomas.

Transcripción y procesamiento del ARNr

Cada región de organización nuclear contiene un grupo de genes de ARNr repetidos en tándem y que están separados entre sí por regiones de ADN espaciador que no se transcribe. Estos genes son transcritos activamente por la ARN polimerasa I, lo que permite que la transcripción se pueda visualizar fácilmente por microscopia electrónica (Fig. 9.28). En las microgra-

Figura 9.28 Transcripción de los genes de ARNr. Una micrografía electrónica de la cromatina nuclear, mostrando tres genes de ARNr separados por ADN espaciador que no se transcribe. Cada gen de ARNr está rodeado por un conjunto de cadenas de ARNr en crecimiento, dando una apariencia en forma de «árbol de navidad». (Cortesía de O. L. Miller, Jr.)



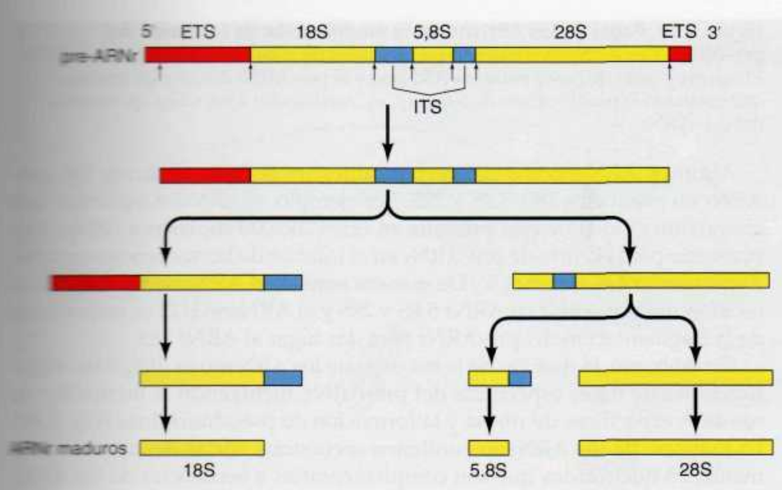


Figura 9.29 Procesamiento del pre-ARNr. El transcrito pre-ARNr 45S contiene espaciadores transcritos externos (ETS) en ambos extremos, y espaciadores transcritos internos (ITS) entre las secuencias de los ARNr 18S, 5,8S y 28S. El pre-ARNr es procesado mediante una serie de escisiones (que se muestran en el caso de un pre-ARNr humano) para originar los ARNr maduros.

fías electrónicas, cada uno de los genes de ARNr colocados en tándem se encuentra rodeado de cadenas de ARN en crecimiento densamente empaquetadas, dando lugar a una estructura en forma de «árbol de navidad». La alta densidad de las cadenas de ARN en crecimiento es debida a la gran cantidad de moléculas de ARN polimerasa, presentes en una densidad máxima de, aproximadamente, una polimerasa por cada cien pares de bases del ADN molde.

El transcrito primario de los genes de ARNr es el pre-ARNr 45S de gran tamaño, que contiene los ARNr 18S, 5,8S y 28S, además de las regiones espaciadoras transcritas (Fig. 9.29). Dos espaciadores externos que son transcritos se localizan en los extremos 5′ y 3′de los pre-ARNr, y dos espaciadores internos se sitúan entre las secuencias de los ARNr 18S, 5,8S y 28S. Los primeros pasos en el procesamiento de este tránscrito son escisiones en el interior del espaciador transcrito externo cerca del extremo 5′ del pre-ARNr y la eliminación del espaciador transcrito externo del extremo 3′ de la molécula. Escisiones posteriores originan los ARNr maduros. Este procesamiento sigue un modelo similar en otras especies, aunque hay ciertas diferencias en el orden de algunas escisiones.

Además de las escisiones, el procesamiento del pre-ARNr implica importantes modificaciones en las bases nitrogenadas, debido a la adición de grupos metilo a algunas bases concretas y a residuos de ribosa, y por la conversión de uridina en pseudouridina (véase Fig. 7.44). En las células animales, el procesamiento del pre-ARNr implica la metilación de aproximadamente cien restos de ribosa y 10 bases, además de la formación de cerca de cien pseudouridinas. La mayoría de estas modificaciones ocurre durante o inmediatamente después de la síntesis del pre-ARNr, aunque algunas tienen lugar en etapas posteriores del procesamiento del pre-ARNr.

El procesamiento del pre-ARNr requiere la intervención de proteínas y ARN localizados en el nucléolo. La participación de ARN nucleares pequeños (ARNsn) en el procesamiento del pre-ARNm ya se explicó en el Capítulo 7. Los nucléolos contienen más de 300 proteínas y un gran número (aproximadamente 200) de **ARN nucleolares pequeños (ARNsno)** que intervienen en el procesamiento del pre-ARNr. Al igual que los ARNsn de los espliceosomas, los ARNsno están unidos a proteínas, formando RNPsno. Cada RNPsno está constituida por un único ARNsno asociado a ocho o diez proteínas. Las RNPsno se unen al pre-ARNr para formar un complejo de procesamiento de manera análoga a como se forman los espliceosomas en el pre-ARNm.

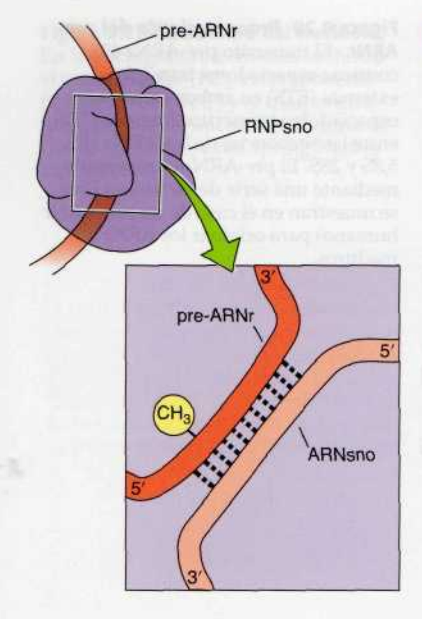


Figura 9.30 Papel de los ARNsno en la modificación de las bases del pre-ARNr. Los ARNsno contienen pequeñas secuencias complementarias al ARNr. El apareamiento de bases entre los ARNsno y el pre-ARNr dirige a las enzimas que catalizan la modificación de bases (p. ej., metilación) a los sitios apropiados del pre-ARNr.

Algunos ARNsno son los responsables de la fragmentación del pre-ARNr en productos 18S, 5,8S y 28S. Por ejemplo, el ARNsno nucleolar más abundante es el U3 y está presente en unas 200.000 copias por célula, y es necesario para el corte de pre-ARNr en el interior de las secuencias espaciadoras transcritas externas 5′. De manera similar, el ARNsno U8 provoca la escisión del pre-ARNr en ARNr 5,8S y 28S y el ARNsno U22 es responsable de la fragmentación del pre-ARNr para dar lugar al ARNr 18S.

Sin embargo, la función de la mayoría de los ARNsno es dirigir las modificaciones de bases específicas del pre-ARNr, incluyendo la metilación de residuos específicos de ribosa y la formación de pseudouridinas (Fig. 9.30). La mayoría de los ARNsno contienen secuencias cortas de, aproximadamente, 15 nucleótidos que son complementarias a secuencias de los ARNr 18S y 28S. Estas regiones complementarias incluyen los sitios de modificación de bases en el ARNr. Mediante el apareamiento de bases con regiones específicas del pre-ARNr, los ARNsno actúan como ARN guías que dirigen a las enzimas que catalizan la metilación de las ribosas o la conversión de uridina en pseudouridina, al sitio adecuado de la molécula de pre-ARNr. Otros ARN aparte del ARNr requieren bases modificadas y se cree que es la localización de RNPsno en el nucléolo lo que es fundamental en su papel más general en la modificación del ARN. Un ejemplo es el ARN de la partícula de reconocimiento de la señal (véase Cap. 10).

Ensamblaje de ribosomas

La formación de los ribosomas implica el ensamblaje del ARN ribosómico precursor con las proteínas ribosómicas y con el ARNr 5S (Fig. 9.31). Los genes que codifican para las proteínas ribosómicas se transcriben fuera del nucléolo por la ARN polimerasa II, originando ARNm que son traducidos en los ribosomas citoplasmáticos. Las proteínas ribosómicas se transportan posteriormente desde el citoplasma al nucléolo, donde se ensamblan con los ARNr para formar partículas prerribosómicas. Aunque los genes para el ARNr 5S también se transcriben fuera del nucléolo, en este caso por la ARN polimerasa III, se ensamblan igualmente en el interior del nucléolo para formar las partículas prerribosómicas.

La asociación de las proteínas ribosómicas con el ARNr comienza mientras ocurre la síntesis del ARNr, y más de la mitad de las proteínas ribosómicas están unidas al pre-ARNr antes de su procesamiento. Las restantes proteínas ribosómicas y el ARNr 5S se incorporan a las partículas prerribosómicas mientras tiene lugar la escisión del pre-ARNr. Durante la primera etapa de la asociación ribosómica, la maduración de las dos subunidades ribosómicas emergentes se diferencia. La maduración de la unidad más pequeña, que sólo contiene ARNr 18S, es más sencilla e implica únicamente cuatro escisiones de la endonucleasa. En los eucariotas superiores esto se completa en el interior del núcleo pero en las levaduras la escisión final para dar el ARNr 18S madura se produce después de la exportación de la subunidad 40S al citosol. El procesamiento de la subunidad mayor, que contiene los ARNr 28S, 5,8S y 5S, implica numerosos cortes por parte de las nucleasas y se completa en el interior del nucléolo. Por tanto, la mayoría de las partículas prerribosómicas del nucléolo son precursoras de las subunidades grandes (60S). Las etapas finales de la maduración de las subunidades ribosómicas siguen a la salida de las partículas prerribosómicas al citoplasma, formando las subunidades ribosómicas eucariotas 40S y 60S.

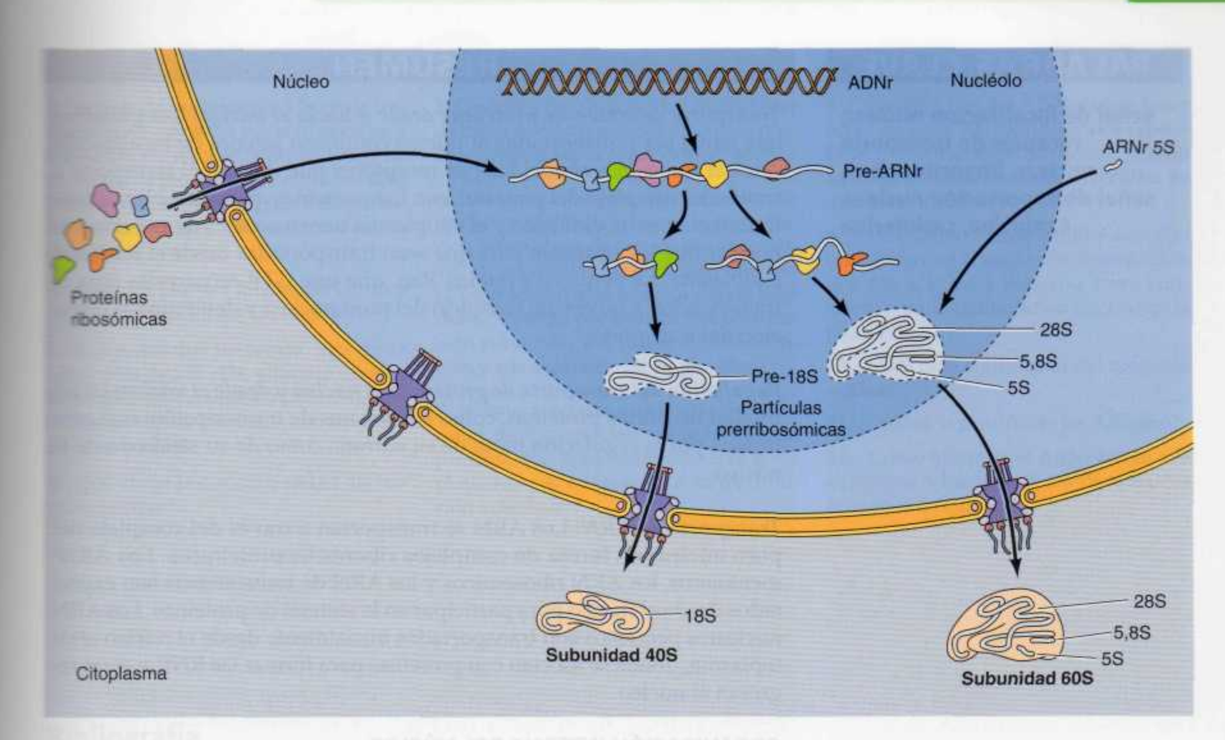


Figura 9.31 Ensamblaje de los ribosomas. Las proteínas ribosómicas se transportan al nucléolo desde el citoplasma y comienzan a ensamblarse con el pre-ARNr antes de su procesamiento. Al mismo tiempo que se procesa el pre-ARNr, proteínas ribosómicas adicionales y el ARNr 5S (que es sintetizado fuera del nucléolo) se ensamblan para formar partículas prerribosómicas. Las etapas finales de la maduración continúan con la salida de las partículas prerribosómicas al citoplasma, originando las subunidades ribosómicas 40S y 60S.

RESUMEN

ENVUELTA NUCLEAR Y TRÁFICO ENTRE EL NÚCLEO Y EL CITOPLASMA

Estructura de la envuelta nuclear: La envuelta nuclear separa el contenido del núcleo y del citoplasma, manteniendo el núcleo como un compartimento bioquímico diferenciado que alberga el material genético y sirve como lugar de transcripción y procesamiento del ARN en las células eucariotas. La envuelta nuclear está formada por una membrana nuclear interna y externa, unidas a nivel de los complejos del poro nuclear, y por una lámina nuclear subyacente.

Complejo del poro nuclear: Los complejos del poro nuclear son estructuras grandes y son las únicas vías a través de las cuales las moléculas pueden viajar entre el núcleo y el citoplasma. Las moléculas pequeñas son capaces de difundir libremente a través de los canales abiertos del complejo del poro nuclear. Las macromoléculas se transportan selectivamente en un proceso dependiente de energía.

PALABRAS CLAVE

envuelta nuclear, membrana nuclear, lámina nuclear, lámina

complejo del poro nuclear

PALABRAS CLAVE / RESUMEN

señal de localización nuclear, receptor de transporte nuclear, importina, Ran, señal de exportación nuclear, exportina, carioferina

Transporte selectivo de proteínas desde y hacia el núcleo: Las proteínas que van a ser transportadas al núcleo contienen señales de localización nuclear que son reconocidas por receptores que dirigen el transporte a través del complejo del poro nuclear. Las proteínas que se desplazan continuamente entre el núcleo y el citoplasma tienen señales de exportación nuclear que las etiquetan para que sean transportadas desde el núcleo al citoplasma. La pequeña proteína Ran, que une GTP, se necesita para la translocación a través del complejo del poro nuclear y determina la dirección del transporte.

Regulación del transporte de proteínas al núcleo y desde el núcleo: La actividad de ciertas proteínas, como los factores de transcripción, está controlada por la regulación tanto de su entrada como de su salida desde el núcleo.

Transporte de ARN: Los ARN se transportan a través del complejo del poro nuclear en forma de complejos ribonucleoproteínicos. Los ARN-mensajeros, los ARN ribosómicos y los ARN de transferencia son exportados desde el núcleo para participar en la síntesis de proteínas. Los ARN nucleares pequeños son transportados inicialmente desde el núcleo al citoplasma, donde se asocian con proteínas para formar las RNP, y éstas regresan al núcleo.

ORGANIZACIÓN INTERNA DEL NÚCLEO

heterocromatina, eucromatina

Cromosomas y estructura de orden superior de la cromatina: El núcleo interfásico contiene heterocromatina altamente condensada, transcripcionalmente inactiva, así como eucromatina descondensada. Los cromosomas interfásicos se organizan en el núcleo y se estructuran en grandes dominios en forma de bucle que funcionan como unidades independientes.

Sub-comportamientos en el interior del núcleo: Algunos procesos nucleares, como la replicación del ADN y el metabolismo del ARNm, pueden localizarse en estructuras subnucleares concretas.

NUCLÉOLO Y PROCESAMIENTO DEL ARNr

nucléolo, región organizadora nucleolar

Genes de ARN ribosómico y la organización del nucléolo: El nucléolo está organizado alrededor de los genes para los ARN ribosómicos. Es el lugar de la transcripción y procesamiento del ARNr, del ensamblaje de los ribosomas y la modificación de diversos ARN pequeños.

ARN nucleolares pequeños (ARNsno)

Transcripción y procesamiento del ARNr: El transcrito primario de los genes de ARNr es el pre-ARNr 45S, que tras su procesamiento origina los ARNr 18S 5,8S y 28S. El procesamiento del pre-ARNr está mediado por los ARN nucleolares pequeños (ARNsno).

Ensamblaje de ribosomas: Las subunidades ribosómicas se ensamblan en el nucléolo a partir de los ARNr y de las proteínas ribosómicas.

Preguntas

1. Separando la transcripción de la traducción, la envuelta nuclear permite a los eucariotas regular la expresión génica mediante procesos que no se encuentran en los procariotas. ¿Cuáles son estos procesos que son exclusivos de eucariotas?

2. ¿Qué dos papeles juegan las láminas en la estructura y función nuclear?

3. Si inyectas dos proteínas, una de 15 kDa y otra de 100 kDa, y las dos carecen de señales de transporte nuclear al interior de un óvulo de rana, ¿entrará alguna en el núcleo?

4. ¿Qué dirige la direccionalidad del importe nuclear?

5. Describe cómo la actividad de un factor de transcripción regulador de un gen puede ser regulada por el importe nuclear.

6. Usted está estudiando un factor de transcripción regulado por la fosforilación de residuos de serina, lo que inactiva la señal de localización nuclear. ¿Cómo afectaría la sustitución de residuos de serina por alanina a la localización subcelular del factor de transcripción y a la expresión de su gen diana?

7. ¿Cómo afectaría una mutación en la señal de exportación nuclear de una proteína que viaja continuamente entre el núcleo y el citoplasma a su distribución subcelular?

8. La replicación del ADN parece tener lugar en unas 200 localizaciones específicas o fábricas de replicación. ¿Cómo localizarías estos dominios en células de mamífero en cultivo?

9. ¿Cómo demostraron Smith y sus colaboradores que la secuencia de aminoácidos 126 a 132 del antígeno T era suficiente para la acumulación nuclear de la proteína?

10. ¿Cuál es el significado del moteado nuclear?

11. ¿Cuál es la función de los ARNsno?

12. ¿Cómo afectaría el ARNi frente a la exportina-t humana a los fibroblastos humanos en cultivo?

Bibliografía

Envuelta nuclear y tráfico entre el *núcleo* y el *citoplasma*

Alber, F., S. Dokudovskaya, L. M. Veenhoff, W. Zhang, J. Kipper, D. Devos, A. Suprapto, O. Karni-Schmidt, R. Williams, B. T. Chait, A. Sali and M. P. Rout. 2007. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 450: 695-701. [P]

Beck, M., V. Lucic, F. Forster, W. Baumeister and O. Medalia. 2007. Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography. *Nature* 449: 611-615. [P]

Chook, Y. M. and G. Blobel. 1999. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-β2-Ran•GppNHp. *Nature* 399: 230–237. [P]

Crisp, M. and B. Burke. 2008. The nuclear envelope as an integrator of nuclear and cytoplasmic architecture. *FEBS Lett.* 582: 2023-2032. [R]

Cronshaw, J. M., A. N. Krutchinsky, W. Zhang, B. T. Chait and M. J. Matunis. 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 158: 915–927. [P]

Goldman, R. D., Y. Gruenbaum, R. D. Moir, D. K. Shumaker and T. P. Spann. 2002. Nuclear lamins: Building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 16: 533–547. [R]

Gruenbaum, Y., A. Margalit, R. D. Goldman, D. K. Shumaker and K. L. Wilson. 2005. The nuclear lamina comes of age. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 21–31. [R]

King, M. C., C. P. Lusk and G. Blobel. 2006. Karyopherin-mediated import of integral inner nuclear membrane proteins. *Nature* 442: 1003-1007. [P]

Kohler, A. and E. Hurt. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 761-773. [R]

Meier, I. 2007. Composition of the plant nuclear envelope: theme and variations. *J. Exp. Bot.* 58: 27-34. [R]

Mosammaparast, N. and L. F. Pemberton. 2004. Karyopherins: From nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol.* 14: 547–556. [R]

Polesello, C. and F. Payre. 2004. Small is beautiful: What flies tell us about ERM protein function in development. *Trends Cell Biol.* 14: 294–302. [R]

Presgraves, D. C., L. Balagopalan, S. M. Abmayr and H. A. Orr. 2003. Adaptive evolution drives divergence of a hybrid inviability gene between two species of Drosophila. *Nature* 423: 715–719. [P]

Quimby, B. B. and M. Dasso. 2003. The small GTPase Ran: Interpreting the signs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 338–344. [R]

Stewart, M. 2007. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 195-208. [R]

Tran, E. J. and S. R. Wente. 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125: 1041-1053. [R]

Vetter, I. R., A. Arndt, U. Kutay, D. Gorlich and A. Wittinghofer. 1999. Structural view of the Ran-importin β interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* 67: 635–646. [P]

Weis, K. 2003. Regulating access to the genome: Nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112: 441–451. [R]

Organización interna del núcleo

Bernardi, R. and P. P. Pandolfi. 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 1006-1016. [R]

Branco, M. R. and A. Pombo. 2007. Chromosome organization: new facts, new models. *Trends Cell Biol.* 17: 127-134. [R]

Gall, J. G. 2000. Cajal bodies: The first 100 years. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 273–300. [R]

Grosshans, H., K. Deinert, E. Hurt and G. Simos. 2001. Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. *J. Cell Biol.* 153: 745–762. [P]

Johnson, A. W., E. Lund and J. Dahlberg. 2002. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci.* 27: 580–585. [R]

Kennedy, B. K., D. A. Barbie, M. Classon, N. Dyson and E. Harlow. 2000. Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev.* 14: 2855–2868. [P]

Lanctôt, C., T. Cheutin, M. Cremer, G. Cavalli and T. Cremer. 2007. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nature Rev. Genet.* 8: 104-115. [R]

Misteli, T., J. F. Caceres and D. L. Spector. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387: 523–527. [P]

Sexton, T., H. Schober, P. Fraser and S. M. Gasser. 2007. Gene regulation through nuclear organization. *Nature Struct. Mol. Biol.* 14: 1049-1055. [R]

Taddei, A., H. G. Van, F. Hediger, V. Kalck, F. Cubizolles, H. Schober and S. M. Gasser. 2006. Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature* 441: 774-778. [P]

Takahashi, Y., V. Lallemand-Breitenbach, J. Zhu and T. H. de Thé. 2004. PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* 23: 2819–2824. [R]

Trinkle-Mulcahy, L. and A. I. Lamond. 2008. Nuclear functions in space and time: Gene expression in a dynamic, constrained environment. *FEBS Lett.* 582: 1960-1970. [R]

Vartiainen, M. K. 2008. Nuclear actin dynamics–From form to function. *FEBS Lett.* 582:2033-2040. [R]

Nucléolo y procesamiento del ARNr

Granneman, S. and S. J. Baserga. 2004. Ribosome biogenesis: Of knobs and RNA processing. *Exp. Cell Res.* 296: 43–50. [R]

Kiss, T. 2002. Small nucleolar RNAs: An abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109: 145–148. [R]

Miller, O. L., Jr. and B. Beatty. 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science* 164: 955–957. [P]

Nazar, R. N. 2004. Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. *IUBMB Life* 56: 457–465. [R]

Olson, M. O., K. Hingorani and A. Szebeni. 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.* 219: 199–266. [R]

Thiry, M. and D. L. Lafontaine. 2005. Birth of a nucleolus: The evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* 15: 194–199. [R]

Zemp, I. and U. Kutay. 2007. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Lett.* 581:2783-2793. [R]

CAPÍTULO **10**

Distribución y transporte de proteínas

Retículo endoplásmico, aparato de Golgi y lisosomas

ADEMÁS DE POR LA PRESENCIA DE UN NÚCLEO, las células eucariotas se distinguen de las células procariotas por la presencia en el citoplasma de orgánulos rodeados de membrana. Estos orgánulos proporcionan compartimentos diferenciados en los que tienen lugar actividades celulares específicas, y la subdivisión resultante del citoplasma permite a las células eucariotas funcionar eficientemente a pesar de su gran tamaño (aproximadamente 1.000 veces el volumen de las bacterias).

Debido a la compleja organización interna de las células eucariotas, distribuir y dirigir a las proteínas hacia sus destinos adecuados son tareas considerables. El primer paso en la distribución de las proteínas tiene lugar mientras aún está en marcha la traducción. Muchas proteínas destinadas al *retículo endoplásmico*, al *aparato de Golgi*, a los *lisosomas*, a la *membrana plasmática* y a ser secretadas se sintetizan en los ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico. A medida que la traducción continúa, las cadenas polipeptídicas se transportan al interior del retículo endoplásmico, donde tiene lugar el plegamiento y procesamiento de las proteínas. Desde el retículo endoplásmico, las proteínas se transportan en vesículas al aparato de Golgi, donde son nuevamente procesadas y distribuidas para el transporte a los lisosomas, a la membrana plasmática o a ser secretadas desde la célula. Algunos de estos orgánulos, además de los endosomas, participan en la organización y el transporte de proteínas que son internalizadas desde el exterior celular (véase Cap. 13). El retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los lisosomas se diferencian de esta manera de otros orgánulos citoplásmicos en que intervienen conjuntamente en el procesamiento de las proteínas y en que están conectados mediante vesículas de transporte.

Retículo endoplásmico

El **retículo endoplásmico (ER)** es una red de túbulos y sacos (cisternas) rodeados de membrana que se extiende desde la membrana nuclear por todo el citoplasma (Fig. 10.1). Todo el retículo endoplásmico está rodeado por una membrana continua y es el orgánulo más grande de la mayoría de las células eucariotas. Su membrana puede representar aproximadamente la mitad de todas las membranas de la célula, y el espacio encerrado por el RE (la luz, o espacio de las cisternas) puede representar alrededor del 10% de todo el vo-

(A) Retículo endoplásmico rugoso





(B) Retículo endoplásmico liso

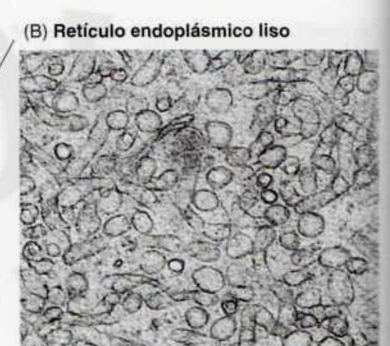


Figura 10.1 Retículo endoplásmico (RE). (A) Microfotografía electrónica del RE rugoso en células de hígado de rata. Los ribosomas están unidos a la cara citosólica de la membrana del RE. (B) Microfotografía electrónica del RE liso en las células de Leydig del testículo, que participan activamente en la síntesis de hormonas esteroideas. (A, Richard Rodewald, University of Virginia/Biological Photo Service; B, Dan Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

lumen celular. Como se trató previamente, hay dos tipos distintos de RE que realizan funciones diferentes en la célula. El **RE rugoso**, que está cubierto por ribosomas en su superficie externa, y el **RE de transición**, de donde parten vesículas hacia el aparato de Golgi, funcionan ambos en el procesamiento de las proteínas. El **RE liso** no está asociado con los ribosomas y está implicado en el metabolismo de los lípidos, en lugar de en el de las proteínas.

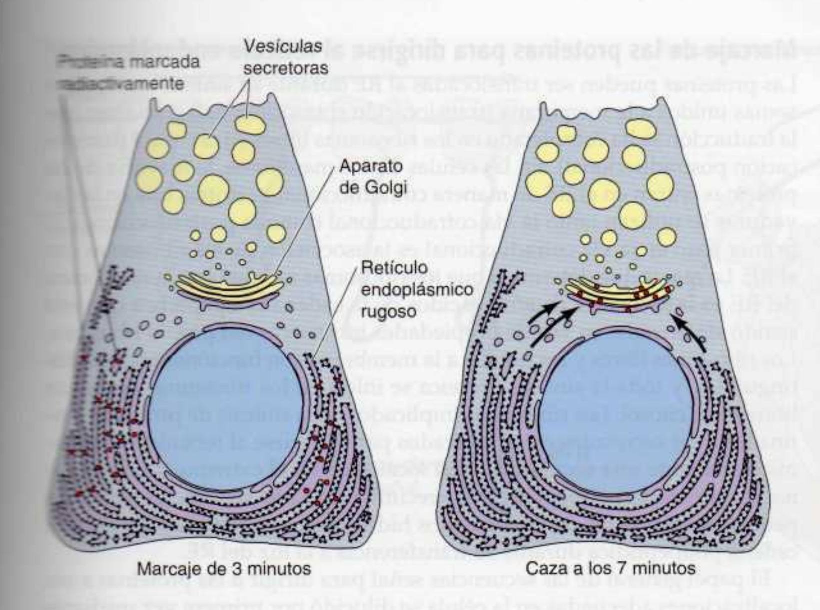
Retículo endoplásmico y secreción de proteínas

El papel del retículo endoplásmico en el procesamiento y distribución de las proteínas fue demostrado por primera vez por George Palade y sus colaboradores en los años 60 (Fig. 10.2). Estos investigadores estudiaron el destino de las proteínas recién sintetizadas en unas células especializadas del páncreas (células pancreáticas acinares) que secretan enzimas digestivas al intestino delgado. Debido a que la mayoría de las proteínas sintetizadas por estas células son secretadas, Palade y colaboradores fueron capaces de estudiar la ruta tomada por las proteínas secretadas simplemente mediante el marcaje con aminoácidos radiactivos de las proteínas recién sintetizadas. La localización en la célula de las proteínas marcadas radiactivamente se determinó a continuación mediante una autorradiografía, poniendo de manifiesto los lugares celulares implicados en los procesos que conducen a la secreción de las proteínas. Después de una breve exposición de las células acinares pancreáticas a los aminoácidos radiactivos, se detectaron proteínas sintetizadas *de novo* en el RE rugoso, por lo que se le identificó como el lugar de síntesis de las proteínas destinadas a la secreción. Si a continuación las células se incubaban durante un corto período de tiempo en un medio que contenía aminoácidos no radiactivos (proceso conocido como *caza*), las proteínas marcadas radiactivamente se detectaban en el aparato de Golgi. Tras períodos de caza más largos, las proteínas marcadas radiactivamente migraban desde el aparato de Golgi a la superficie celular en **vesículas de secreción**, que posteriormente se fusionaban con la membrana plasmática para liberar su contenido fuera de la célula.

Estos experimentos definieron una vía tomada por las proteínas secretadas, la **vía secretora:** RE rugoso → Golgi → vesículas de secreción-exterior de la célula. Estudios adicionales ampliaron estos resultados y demostraron que esta vía no está restringida a las proteínas destinadas a ser secretadas. Las proteínas de la membrana plasmática y las lisosómicas también migran desde el RE rugoso hasta el Golgi y posteriormente a sus destinos finales. Otras proteínas pasan por las etapas iniciales de la vía secretora pero posteriormente son retenidas y su actividad tiene lugar en el RE o en el aparato de Golgi.

Por tanto, la entrada de las proteínas en el RE representa un cruce de caminos muy importante en el tráfico de proteínas en las células eucariotas.

■ **El retículo endoplásmico también juega un papel clave en la transducción de la señal actuando como uno de los depósitos principales de calcio intracelular. La liberación de calcio desde el RE en respuesta a las señales apropiadas altera la actividad de las proteínas citosólicas clave y juega un papel muy importante en la contracción muscular (véanse Caps. 12 y 15).**



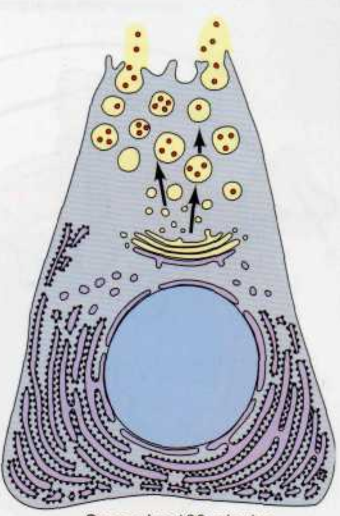


Figura 10.2 Vía secretora. Las células acinares pancreáticas, que secretan la mayor parte de sus proteínas sintetizadas de novo en el tracto digestivo, se marcaron con aminoácidos radiactivos para estudiar la vía intracelular utilizada por las proteínas secretadas. Tras un corto periodo de incubación con *aminoácidos radiactivos (marcaje de 3 minutos)*, la autorradiografía puso de manifiesto que las proteínas sintetizadas de novo se localizaban en el RE rugoso. Tras una incubación posterior con aminoácidos no radiactivos (caza), se observó que las proteínas se habían desplazado desde el RE al aparato de Golgi y después, en el interior de vesículas de secreción, a la membrana plasmática y al exterior de la célula.

Las proteínas destinadas a ser secretadas o a *incorporarse* en el RE, aparato de Golgi, lisosomas, o membrana plasmática son dirigidas inicialmente al RE. En las células de los mamíferos, la mayoría de las proteínas son transferidas al RE mientras están siendo traducidas por los ribosomas unidos a la membrana (Fig. 10.3). Por el contrario, las proteínas destinadas a permanecer en el citosol o que se van a incorporar al núcleo, a las mitocondrias, cloroplastos o peroxisomas son sintetizadas en los ribosomas libres y liberadas al citosol cuando finaliza su traducción.

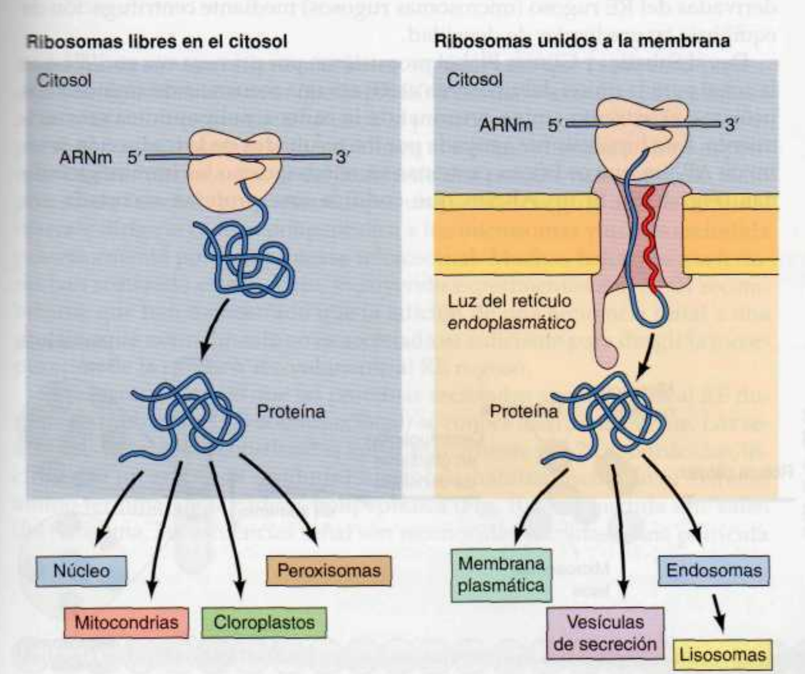


Figura 10.3 Esquema general de la distribución de las proteínas. En las células de los mamíferos, la distribución inicial de las proteínas al RE se produce mientras tiene lugar la traducción. Las proteínas sintetizadas en los ribosomas libres permanecen en el citosol o son transportadas al núcleo, mitocondrias, cloroplastos o peroxisomas. Por el contrario, las *proteínas sintetizadas en los ribosomas* unidos a la membrana se traslocan directamente al interior del RE mientras se están traduciendo. Pueden ser retenidas en el RE o transportadas al aparato de Golgi, y de allí a los endosomas, a la membrana plasmática, o al exterior celular mediante vesículas de secreción.

Marcaje de las proteínas para dirigirse al retículo endoplásmico

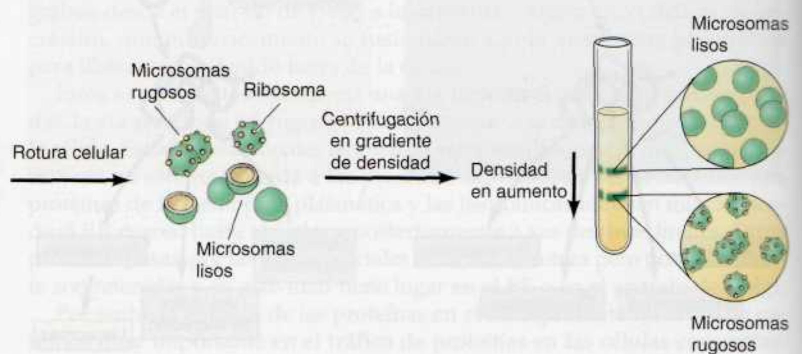
Las proteínas pueden ser translocadas al RE durante su síntesis en los ribosomas unidos a la membrana (translocación cotraduccional) o una vez que la traducción se ha completado en los ribosomas libres en el citosol (translocación postraduccional). En las células de los mamíferos, la mayoría de las proteínas entran en el RE de manera cotraduccional, mientras que en las levaduras se utilizan tanto la vía cotraduccional como la postraduccional. El primer paso en la vía cotraduccional es la asociación de los ribosomas con el RE. La marca que determina que los ribosomas se unan con la membrana del RE es la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica que está siendo sintetizada, en vez de propiedades intrínsecas del propio ribosoma. Los ribosomas libres y los unidos a la membrana son funcionalmente indistinguibles, y toda la síntesis proteica se inicia en los ribosomas que están libres en el citosol. Los ribosomas implicados en la síntesis de proteínas destinadas a ser secretadas están marcados para dirigirse al retículo endoplásmico mediante **una secuencia señal** localizada en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento. Estas secuencias señal son pequeños segmentos de aminoácidos hidrófobos que son escindidos de la cadena polipeptídica durante su transferencia a la luz del RE.

El papel general de las secuencias señal para dirigir a las proteínas a sus localizaciones adecuadas en la célula se dilucidó por primera vez mediante estudios sobre la internalización de las proteínas de secreción en el RE. Estos experimentos utilizaron preparaciones *in vitro* de RE rugoso, que se aislaron de extractos celulares mediante centrifugación en un gradiente de densidad (Fig. 10.4). Cuando las células se rompen, el RE se fragmenta en pequeñas vesículas denominadas **microsomas**. Puesto que las vesículas derivadas del RE rugoso están recubiertas por ribosomas, éstas pueden separarse de vesículas similares derivadas del RE liso o de otras membranas (p. ej., la membrana plasmática). Concretamente, la gran cantidad de ARN existente en los ribosomas aumenta la densidad de las vesículas de membrana a las que están unidos, permitiendo la purificación de las vesículas derivadas del RE rugoso (microsomas rugosos) mediante centrifugación de equilibrio en gradientes de densidad.

David Sabatini y Günter Blobel propusieron por primera vez en 1971 que la señal para la unión del ribosoma al RE era una secuencia de aminoácidos próxima al extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento. Esta hipótesis fue apoyada por los resultados de la traducción *in vitro* de ARNm que codifican proteínas secretadas, como las inmunoglobulinas (Fig. 10.5). Si un ARNm que codifica una proteína secretada era

Figura 10.4 Aislamiento del RE rugoso. Cuando las células se rompen, el RE se fragmenta en pequeñas vesículas denominadas microsomas. Los microsomas derivados del RE rugoso (microsomas rugosos) están rodeados por ribosomas en su superficie externa. Debido a que los ribosomas contienen una gran cantidad de ARN, los microsomas rugosos son más densos que los microsomas lisos y se pueden aislar mediante centrifugación de equilibrio en gradiente de densidad.





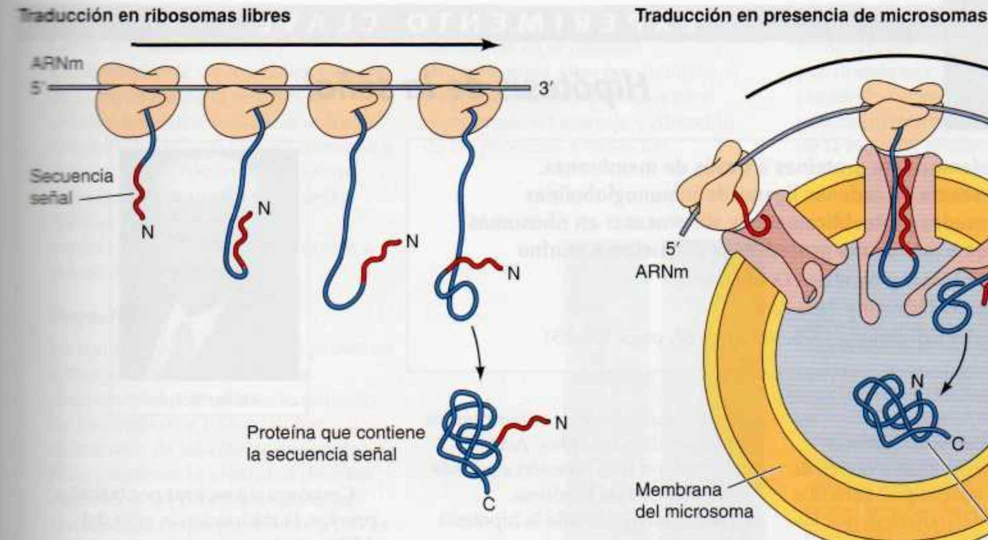


Figura 10.5 Incorporación de las proteínas de secreción a los microsomas. Las proteínas de secreción son dirigidas al RE por una secuencia señal localizada en su extremo amino(N)-terminal, que se elimina durante la incorporación de la cadena polipeptídica en crecimiento al RE. Esto se demostró mediante experimentos que mostraron que la traducción de los ARNm de una proteína de secreción en los ribosomas libres daba lugar a proteínas que mantenían su secuencia señal y que por tanto eran ligeramente más grandes que las proteínas de secreción normales. Sin embargo, cuando se añadían microsomas al sistema, las cadenas polipeptídicas en crecimiento se incorporaban a los microsomas y las secuencias señal eran eliminadas mediante una rotura proteolítica.

traducido *in vitro* por ribosomas libres, se observaba que la proteína producida era ligeramente mayor que la proteína normal secretada. Sin embargo, si se añadían microsomas al sistema la proteína traducida *in vitro* se incorporaba a los microsomas y se escindía en el tamaño adecuado. Estos experimentos condujeron a que se formulara de una manera más detallada la hipótesis de la señal, proponiendo que una secuencia guía amino-terminal marca y dirige la cadena polipeptídica a los microsomas y que es escindida posteriormente por una proteasa microsomal. Muchos hallazgos posteriores han sostenido este modelo, incluyendo experimentos con ADN recombinante que han demostrado que la adición de una secuencia señal a una proteína que normalmente no es secretada es suficiente para dirigir la incorporación de la proteína recombinante al RE rugoso.

El mecanismo por el que las proteínas secretadas son dirigidas al RE durante su traducción (vía cotraduccional) se conoce bien actualmente. Las secuencias señal están constituidas aproximadamente por 20 aminoácidos, incluyendo un grupo de residuos hidrófobos, habitualmente en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica (Fig. 10.6). A medida que salen del ribosoma, las secuencias señal son reconocidas y unidas a una **partícula**

Figura 10.6 Secuencia señal de la hormona del crecimiento. La mayoría de las secuencias señal contienen un segmento de aminoácidos hidrófobos, precedido por residuos básicos (p. ej., arginina).

Sitio de escisión de la peptidasa señal

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr



EXPERIMENTO CLAVE

Hipótesis de la señal

Transferencia de proteínas a través de membranas. I. Presencia de cadenas ligeras de inmunoglobulinas procesadas proteolíticamente y sin procesar en ribosomas unidos a membrana procedentes de mieloma murino

Günter Blobel y Bernhard Dobberstein

Rockefeller University, New York

Journal of Cell Biology, 1975, Volumen 67, págs. 835-851



Günter Blobel

Contexto

¿Cómo se transfieren las cadenas polipeptídicas específicas a través de las membranas adecuadas? Estudios en los años 50 y 60 indicaban que las proteínas secretadas eran sintetizadas en ribosomas unidos a membrana y que se transferían a través de la membrana durante su síntesis. Sin embargo, esto no explicaba por qué los ribosomas implicados en la síntesis de las proteínas secretadas se unen a la membrana mientras que los ribosomas que sintetizan las proteínas citosólicas no lo hacen. Una hipótesis para explicar esta diferencia fue sugerida por primera vez por Günter Blobel y David Sabatini en 1971. En ese momento propusieron que: 1) Los ARNm que se traducían en los ribosomas unidos a membrana contenían un conjunto característico de codones justo en 3' a partir del sitio de iniciación, 2) la traducción de estos codones genera una secuencia característica en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento (la secuencia señal), y 3) la secuencia señal provoca la unión del ribosoma a la membrana. En 1975, Blobel y Dobberstein informaron acerca de una serie de experimentos que apoyaban esta idea. Además, propusieron una «versión algo más detallada de esta hipótesis, en lo sucesivo llamada la hipótesis de la señal».

Experimentos

Los mielomas son cánceres de linfocitos B que secretan inmunoglobulinas activamente, por lo que proporcionan un buen modelo para los estudios de proteínas secretadas. Estudios previos en el laboratorio de Cesar Milstein habían demostrado que las proteínas producidas por la traducción *in vitro* del ARNm de la cadena ligera de las inmunoglobulinas contienen aproximadamente 20 aminoácidos en su extremo amino-terminal que no están presentes en las cadenas ligeras secretadas. Este resultado condujo a la suposición de que estos aminoácidos dirigen la unión del ribosoma a la membrana. Para comprobar esta idea, Blobel y Dobberstein investigaron la síntesis de cadenas ligeras, por ribosomas unidos a membrana, a partir de las células del mieloma.

Como era de esperar por trabajos previos, la traducción *in vitro* del ARNm de las cadenas ligeras en los ribosomas libres daba lugar a una proteína que era más grande que la cadena ligera secretada (véase la figura). Por el contrario, la traducción *in vitro* del ARNm asociado a los ribosomas unidos a membrana de las células del mieloma, daba lugar a una proteína que tenía el mismo tamaño que la cadena ligera secretada normal. Es más, las cadenas ligeras sintetizadas por los ribosomas que permanecían unidos a los microsomas eran resistentes a la digestión por proteasas añadidas, lo que indicaba que las cadenas ligeras habían sido trasferidas a los microsomas.

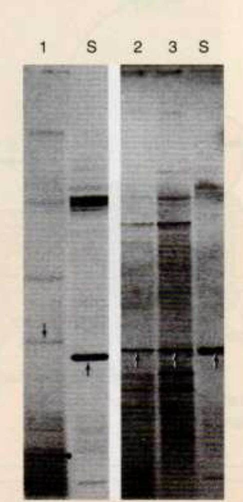
Estos resultados indicaban que una secuencia señal amino-terminal es eliminada por una proteasa en los microsomas a medida que las cadenas polipeptídicas en crecimiento se trasfieren a través de la membrana. Los resultados se interpretaron en términos de una versión más detallada de la hipótesis de la señal.

de reconocimiento de la señal (ARNsrp) que está constituida por seis polipéptidos y un ARN citoplásmico pequeño (**ARNsrp**) (Fig. 10.7). La PRS se une tanto al ribosoma como a la secuencia señal, inhibiendo la traducción y dirigiendo todo el complejo (PRS, ribosoma, y la cadena polipeptídica en crecimiento) al RE mediante la unión al **receptor de la PRS** en la membrana del RE (Fig. 10.8). Estudios estructurales recientes han demostrado que tanto las proteínas SRP como el ARNsrp están implicados en la interacción con el ribosoma, donde el ARNsrp se une tanto a las proteínas como al ARNr de la subunidad mayor ribosómica. La unión al receptor libera a la PRS del ribosoma y de la secuencia señal de la cadena polipeptídica en crecimiento.

Como expusieron Blobel y Dobberstein «la característica esencial de la hipótesis de la señal es la existencia de una secuencia única de codones, localizada inmediatamente a la derecha del codón de iniciación, que está presente sólo en aquellos ARNm cuyos productos de traducción han de ser transferidos a través de una membrana».

Impacto

La transferencia selectiva de proteínas a través de las membranas es fundamental para el mantenimiento de los orgánulos rodeados por membrana de las células eucariotas. Para mantener la identidad de estos orgánulos, las proteínas deben ser translocadas específicamente a través de las membranas apropiadas. La hipótesis de la señal proporcionó la base conceptual para comprender este fenómeno. Este modelo básico no sólo ha sido comprobado firmemente para la transferencia de proteínas secretadas en el retículo endoplásmico, sino que también ha proporcionado el marco para comprender el marcaje y dirección de las proteínas a todos los compartimentos de la célula rodeados por membrana, y por consiguiente causando un impacto en prácticamente todas las áreas de la biología celular.



La traducción *in vitro* del ARNm de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas en ribosomas libres (carril 1) da lugar a un producto que migra más lentamente que las cadenas ligeras secretadas (carril S) en la electroforesis en gel. Por el contrario, las cadenas ligeras sintetizadas por la traducción *in vitro* en ribosomas unidos a membranas (carril 2) tienen el mismo tamaño que las cadenas ligeras secretadas. Además, a los productos de la traducción *in vitro* en ribosomas unidos a membrana no les afectó la digestión posterior con proteasas (carril 3), lo que indica que estaban protegidos de las proteasas por la inserción en los microsomas.

Entonces el ribosoma se une a un complejo de translocación de proteínas en la membrana del RE, y la secuencia señal es insertada en un canal de la membrana o **translocón**. Todo el proceso está coordinado por la unión de GTP tanto al SRP como al receptor SRP, con hidrólisis de GTP a GDP desencadenando la disociación de SRP tanto del receptor como del complejo ribosoma-ARNm.

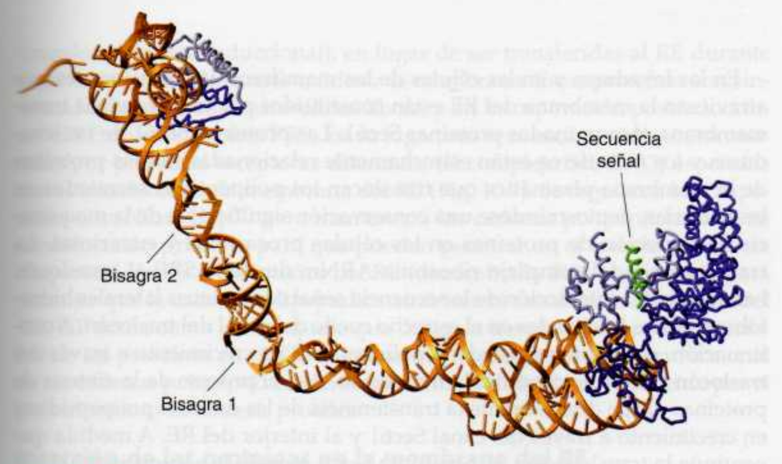
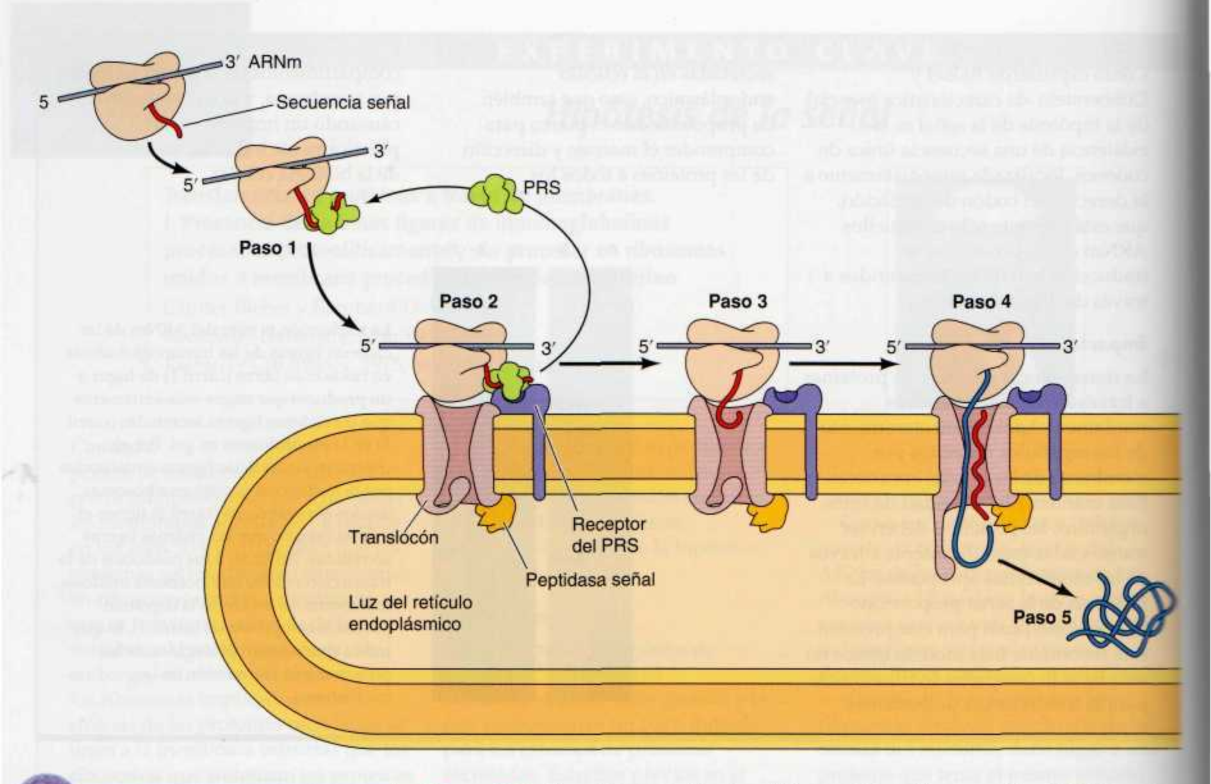


Figura 10.7 Estructura de la SRP. Las proteínas SRP (azul) están asociadas con el ARN SRP (naranja), que posee dos regiones bisagra flexibles. La secuencia señal de la proteína naciente (verde) se une a un bolsillo presente en las proteínas SRP. (Basado en Halic y cols., 2004. *Nature* 427:808.)



10.1 Animación web

Dirección cotraduccional de proteínas de secreción al RE

En las células de mamífero, la principal vía de traslocación de proteínas al RE es una vía cotraduccional que requiere la presencia de una secuencia señal en la proteína recién formada.

Figura 10.8 Dirección cotraduccional de proteínas de secreción al RE. **Paso 1:** A medida que la secuencia señal emerge del ribosoma, es reconocida y unida a la partícula de reconocimiento de la señal (PRS). **Paso 2:** La PRS acompaña al complejo hasta la membrana del RE, donde se une al receptor de la PRS. **Paso 3:** La PRS se libera, el ribosoma se une a un translocón y la secuencia señal se inserta en un canal de membrana. **Paso 4:** La secuencia señal abre el translocón. Se reanuda la traducción, y la cadena polipeptídica en crecimiento es translocada a través de la membrana. **Paso 5:** La escisión de la secuencia señal por la peptidasa de la señal libera el polipéptido en la luz del RE.

En las levaduras y en las células de los mamíferos, los translocones que atraviesan la membrana del RE están constituidos por tres proteínas transmembrana, denominadas proteínas Sec61. Las proteínas Sec61 de las levaduras y los mamíferos están estrechamente relacionadas con las proteínas de la membrana plasmática que translocan los polipéptidos secretados en las bacterias, demostrándose una conservación significativa de la maquinaria de secreción de proteínas en las células procariotas y eucariotas. La transferencia del complejo ribosoma-ARNm desde la SRP al translocón hace posible la interacción de la secuencia señal con cadenas laterales hidrofóbicas cortas localizadas en el estrecho cuello del canal del traslocón. A continuación, se transfiere la cadena polipeptídica en crecimiento a través del traslocón conforme continúa la traducción. Así, el proceso de la síntesis de proteínas dirige directamente la transferencia de las cadenas polipeptídicas en crecimiento a través del canal Sec61 y al interior del RE. A medida que continúa la translocación, la **peptidasa señal** escinde la secuencia señal y el polipéptido es liberado en la luz del RE.

Muchas proteínas en las levaduras, así como algunas proteínas en las células de los mamíferos, son dirigidas al RE tras haber sido traducidas

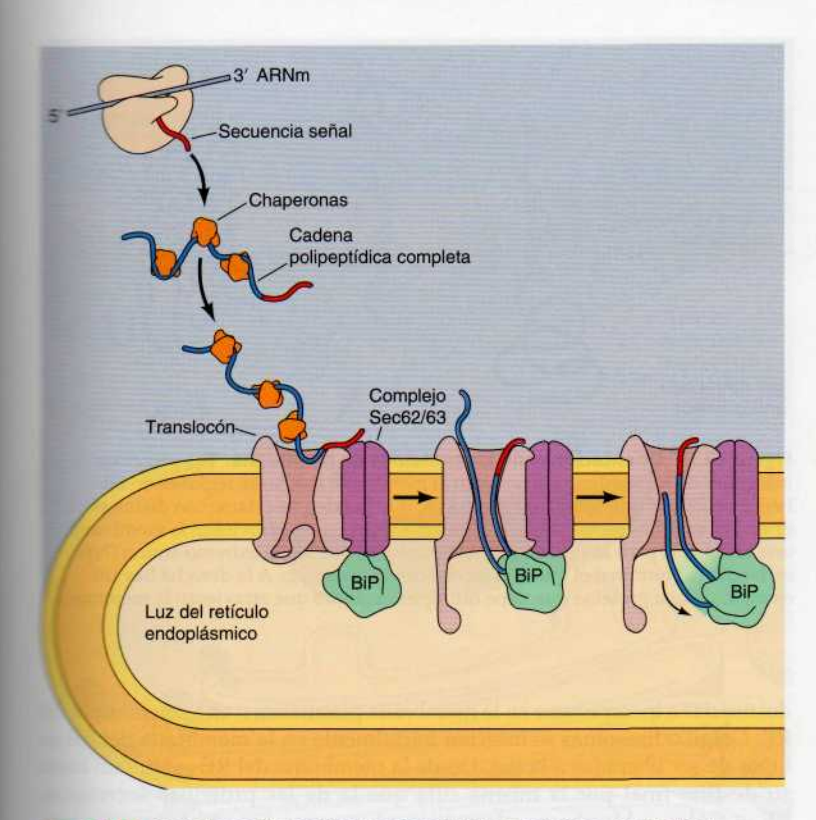


Figura 10.9 Translocación postraduccional de las proteínas en el RE. Las proteínas destinadas a una internalización postraduccional al RE se sintetizan en ribosomas libres y se mantienen en una conformación desplegada mediante chaperonas citosólicas. Sus secuencias señal son reconocidas por el complejo Sec62/63, que está asociado con el translocón en la membrana del RE. La proteína Sec63 también está asociada con una proteína chaperona (BiP), que actúa como un «trinquete» molecular dirigiendo la translocación de la proteína al interior del RE.

(translocación postraduccional), en lugar de ser transferidas al RE durante su síntesis en los ribosomas unidos a la membrana. Estas proteínas son sintetizadas en ribosomas citosólicos libres, y su incorporación postraduccional al RE no requiere una PRS. En su lugar, sus secuencias señal son reconocidas por proteínas receptoras diferentes (el complejo Sec62/63) asociadas con el translocón en la membrana del RE (Fig. 10.9). Se requieren las chaperonas citosólicas Hsp70 para mantener a las cadenas polipeptídicas en su conformación primaria para que puedan penetrar en el translocón, y otra chaperona Hsp70 en el interior del RE (denominada BiP) es necesaria para permitir que la cadena polipeptídica atraviese el canal hasta el interior del RE. BiP actúa como un trinquete que dirige la translocación postraduccional de las proteínas en el RE, mientras que la translocación cotraduccional de las cadenas polipeptídicas en crecimiento es dirigida directamente por el procedimiento de síntesis proteica.

Inserción de las proteínas en la membrana del RE

Las proteínas cuyo destino es ser secretadas o residir en la luz del RE, aparato de Golgi, o lisosomas son translocadas a través de la membrana y liberadas en la luz del RE tal como ya se ha descrito. Sin embargo, las proteínas

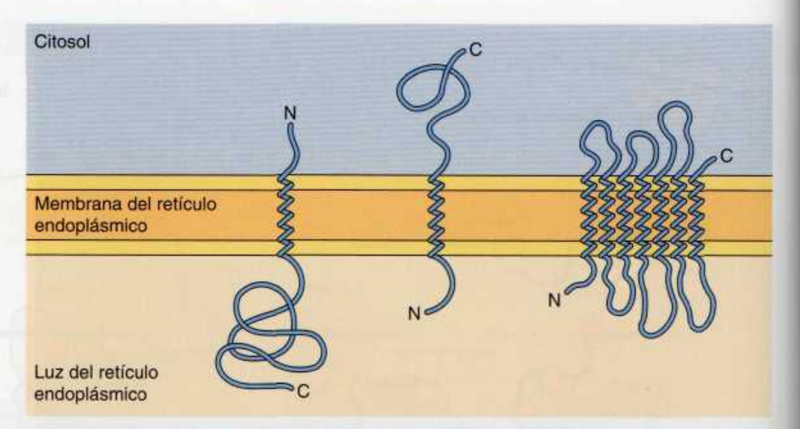


Figura 10.10 Orientaciones de las proteínas de membrana. Las proteínas integrales de la membrana atraviesan la membrana mediante regiones en alfa-hélice de 20 a 25 aminoácidos hidrófobos, que pueden insertarse con distintas orientaciones. Las proteínas de la izquierda y del centro atraviesan la membrana una única vez, pero se diferencian en función de que sea el extremo amino (N) o carboxilo (C) terminal el que está en el lado citoplásmico. A la derecha hay un ejemplo de una proteína que tiene múltiples regiones que atraviesan la membrana.

destinadas a incorporarse en la membrana plasmática o en la membrana del RE, Golgi, o lisosomas se insertan inicialmente en la membrana del RE en lugar de ser liberadas a la luz. Desde la membrana del RE continúan hasta su destino final por la misma ruta que la de las proteínas secretadas: RE → Golgi → Membrana plasmática o lisosomas. Sin embargo, estas proteínas son transportadas a lo largo de esta ruta como componentes de la membrana, en lugar de como proteínas solubles.

Las proteínas integrales de la membrana se incluyen en la membrana mediante regiones hidrofóbicas que atraviesan la bicapa lipídica (véase Fig. 2.25). Las partes de estas proteínas que atraviesan la membrana suelen ser regiones en hélice alfa constituidas por 20 a 25 aminoácidos hidrófobos. La formación de una hélice alfa maximiza los puentes de hidrógeno entre los enlaces peptídicos, y las cadenas laterales hidrófobas de los aminoácidos interaccionan con las colas de ácidos grasos de los fosfolípidos. Sin embargo, las distintas proteínas integrales de la membrana difieren en cómo están insertadas. (Fig. 10.10). Por ejemplo, mientras que algunas proteínas integrales atraviesan la membrana una sola vez, otras tienen múltiples regiones que atraviesan la membrana. Además, algunas proteínas están orientadas en la membrana con su extremo amino-terminal en el lado citosólico; otras tienen su extremo carboxilo-terminal expuesto al citosol. La orientación de las proteínas insertadas en el RE, Golgi, lisosomas y membranas plasmáticas se establece a medida que las cadenas polipeptídicas en crecimiento se translocan en el RE. La luz del RE equivale topológicamente al exterior de la célula, por lo que los dominios de las proteínas de la membrana plasmática que están expuestos en la superficie celular se corresponden con las regiones de la cadena polipeptídica que se translocan al interior del RE (Fig. 10.11).

El mecanismo más directo de inserción en la membrana del RE da como resultado la síntesis de proteínas transmembrana orientadas con sus extremos carboxilo terminal hacia el citosol (Fig. 10.12). Estas proteínas tienen una secuencia señal amino terminal normal, que es escindida por la peptidasa señal durante la translocación de la cadena polipeptídica a través de la

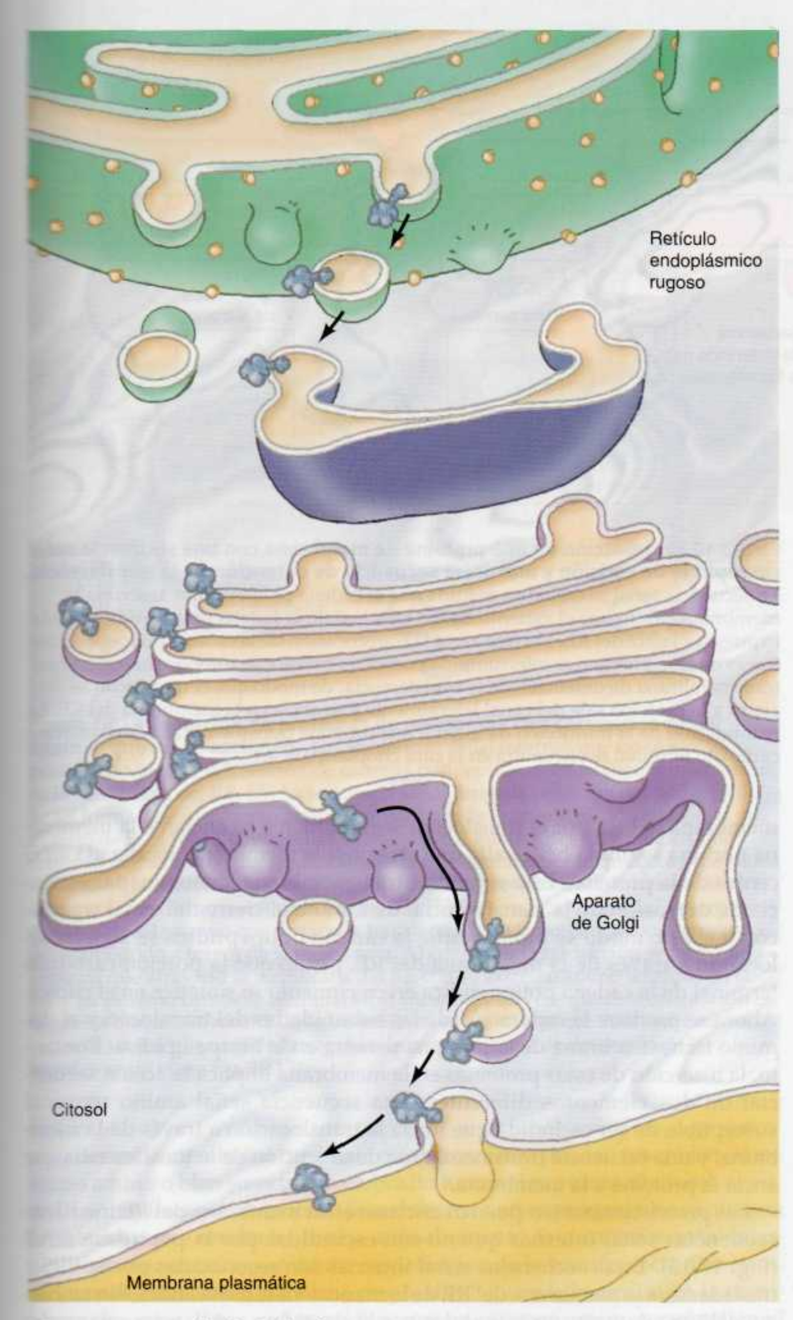


Figura 10.11 Topología de la vía secretora. La luz del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi son topológicamente equivalentes al exterior de la célula. Por tanto, aquellas partes de las cadenas polipeptídicas que se translocan al interior del RE son expuestas en la superficie celular tras su transporte a la membrana plasmática.

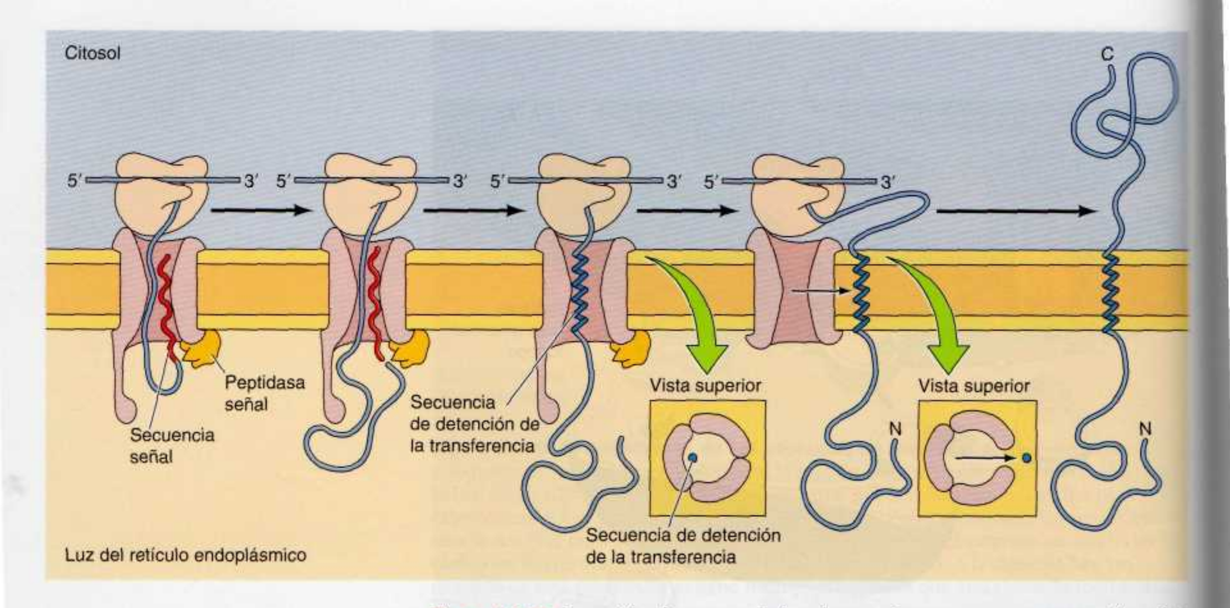
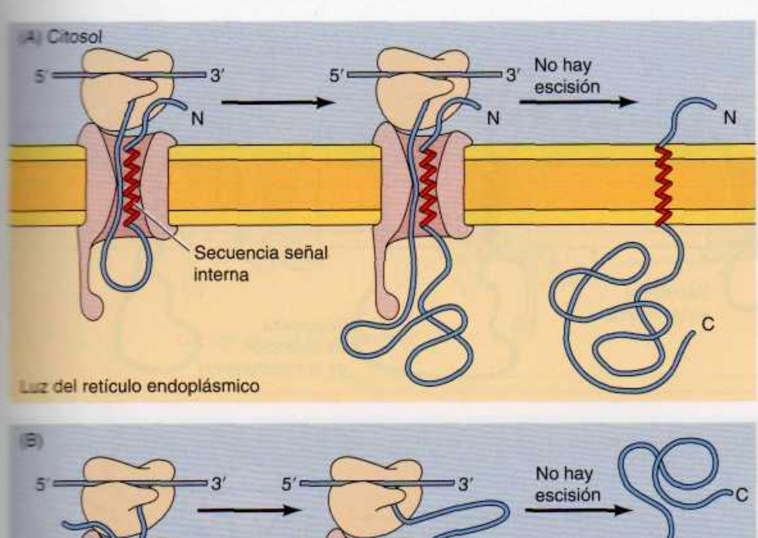


Figura 10.12 Inserción de una proteína de membrana con una secuencia señal susceptible de escisión y una única secuencia de detención de la transferencia. La secuencia señal se escinde a medida que la cadena polipeptídica atraviesa la membrana, por lo que el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica queda expuesto a la luz del RE. Sin embargo, la translocación de la cadena polipeptídica a través de la membrana es interrumpida cuando el translocón reconoce una secuencia transmembrana de detención de la transferencia, de modo que el translocón se cierra y la proteína sale del canal lateralmente y se ancla en la membrana del RE. La reanudación de la traducción da lugar a una proteína transmembrana cuyo extremo carboxilo terminal se encuentra en la cara citoplasmática.

membrana del RE por el translocón. Seguidamente se anclan a la membrana por una segunda hélice alfa que atraviesa la membrana, localizada en el centro de la proteína. Esta secuencia transmembrana, denominada secuencia de detención de la transferencia, determina el cierre del canal translocón. De este modo se bloquea que la cadena polipeptídica se siga translocando a través de la membrana del RE, por lo que la porción carboxilo terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento se sintetiza en el citosol. Ahora se produce la separación de las subunidades del translocón y el dominio transmembrana de la proteína penetra en la bicapa lipídica. Por tanto, la inserción de estas proteínas en la membrana implica la acción secuencial de dos elementos diferentes: una secuencia señal amino terminal susceptible de ser escindida que inicia la translocación a través de la membrana, y una secuencia transmembrana de detención de la transferencia que ancla la proteína a la membrana.

Las proteínas también pueden anclarse en la membrana del RE mediante secuencias señal internas que no son escindidas por la peptidasa señal (Fig. 10.13). Estas secuencias señal internas son reconocidas por la PRS y trasladadas a la membrana del RE de la manera vista hasta ahora. Sin embargo, debido a que no son escindidas por la peptidasa señal, estas secuencias señal actúan como hélices alfa transmembrana que abandonan el canal de translocación y anclan a las proteínas a la membrana del RE. Es importante señalar que las secuencias señal internas pueden estar orientadas de tal manera que dirijan la translocación a través de la membrana bien del extremo amino o bien del extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica. Por tanto, dependiendo de la orientación de la secuencia señal, las proteínas in-



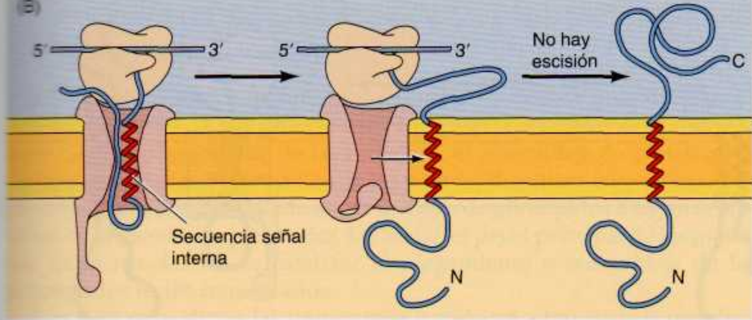


Figura 10.13 Inserción de proteínas de membrana con secuencias señal internas que no se escinden. Las secuencias señal internas que no se escinden pueden dar lugar a la inserción de cadenas polipeptídicas en cualquier orientación en la membrana del RE. (A) La secuencia señal dirige la inserción del polipéptido de tal forma que su extremo amino terminal queda expuesto al lado citosólico. El resto de la cadena polipeptídica se transloca al interior del RE a medida que continúa la traducción. La secuencia señal no se escinde, por lo que actúa como una secuencia que atraviesa la membrana que ancla la proteína a la membrana con su extremo carboxilo terminal en la luz del RE. (B) Otras secuencias señal internas se orientan de tal manera que dirigen la transferencia de la porción amino terminal del polipéptido a través de la membrana. Al continuar la traducción se forma una proteína que atraviesa la membrana del RE con su extremo amino terminal en la luz y su extremo carboxilo terminal en el citosol. Obsérvese que esta orientación es la misma que la que resulta de la inserción de una proteína que contiene una secuencia señal que se escinde seguida de una secuencia de detención de la transferencia (véase Fig. 10.12).

sertadas en la membrana mediante este mecanismo pueden tener bien su extremo amino o bien su extremo carboxilo terminal expuesto al citosol.

Las proteínas que atraviesan la membrana varias veces se piensa que son insertadas como resultado de una serie alternante de secuencias señal internas y secuencias transmembrana de detención de la transferencia. Por ejemplo, una secuencia señal interna puede dar lugar a la inserción en la membrana de una cadena polipeptídica con su extremo amino terminal en el lado citosólico (Fig. 10.14). Si a continuación se encuentra una secuencia de detención de la transferencia, el polipéptido formará un bucle en la luz del RE, y la síntesis de la proteína continuará en el lado citosólico de la membrana. Si aparece una segunda secuencia señal, la cadena polipeptídica en crecimiento se insertará otra vez en el RE, dando lugar a otro dominio en forma de bucle en el lado citosólico de la membrana. A esto le puede seguir

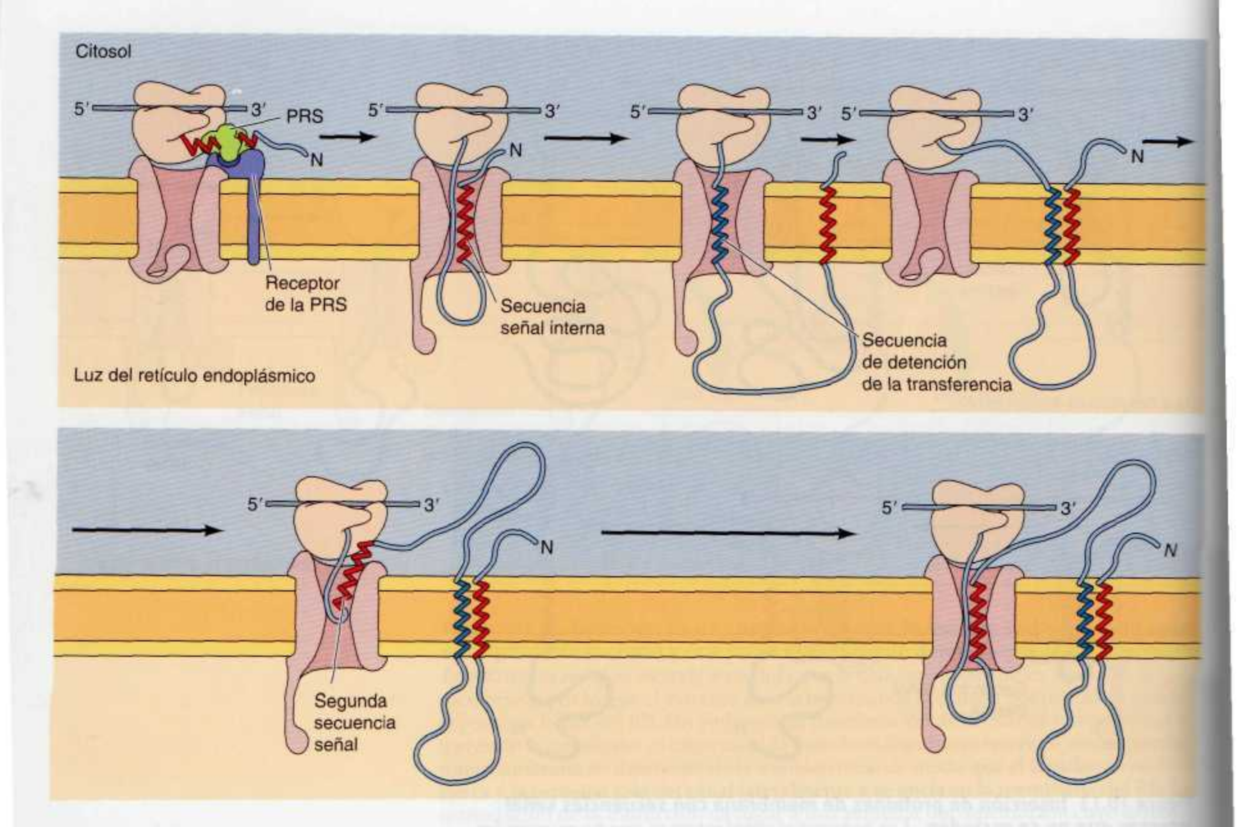


Figura 10.14 Inserción de una proteína que atraviesa la membrana varias veces. En este ejemplo, una secuencia señal interna da lugar a la inserción de la cadena polipeptídica con su extremo amino terminal en el lado citosólico de la membrana. Una secuencia de detención de la transferencia a continuación determina el cierre del canal de translocación, lo que provoca que la cadena polipeptídica forme un bucle en la luz del RE, y la traducción continúa en el citosol. Una segunda secuencia señal interna produce la reapertura del canal, lo que provoca la reinserción de la cadena polipeptídica en la membrana del RE y formándose un bucle en el citosol. El proceso puede repetirse muchas veces, dando lugar a la inserción de proteínas con múltiples regiones que atraviesan la membrana.

otra secuencia de detención de la transferencia, por lo que una serie alternante de secuencias señal y de detención de la transferencia pueden dar lugar a la inserción de las proteínas que atraviesan la membrana varias veces, con dominios en forma de bucle expuestos tanto a la luz del RE como al lado citoplásmico.

Como se analiza más adelante, la mayoría de las proteínas transmembrana destinadas para otros compartimentos de la vía secretora se envían a ellos en vesículas de transporte. Sin embargo, las proteínas que se incorporan a la membrana nuclear interna (que es continua con el RE) difunden lateralmente en la membrana en lugar de transportarse en vesículas. Algunos datos recientes indican que las proteínas de la membrana nuclear interna (como la emerina o LBR; véase Cap. 9) poseen secuencias transmembrana específicas que influyen en su interacción con el translocón y determinan su transporte a la membrana nuclear interna, en la que son retenidas a través de interacciones con diversos componentes nucleares, como las laminitas o la cromatina.

Plegamiento y procesamiento de las proteínas en el RE

El plegamiento de las cadenas polipeptídicas en sus conformaciones tridimensionales correctas, el ensamblaje de los polipéptidos en proteínas constituidas por varias subunidades, y las modificaciones covalentes implicadas en el procesamiento de las proteínas se trataron en el Capítulo 8. Con respecto a las proteínas que entran en la vía secretora, muchos de estos acontecimientos ocurren durante la translocación a través de la membrana del RE o en el interior de la luz del RE. Uno de estos procesos es la rotura proteolí-

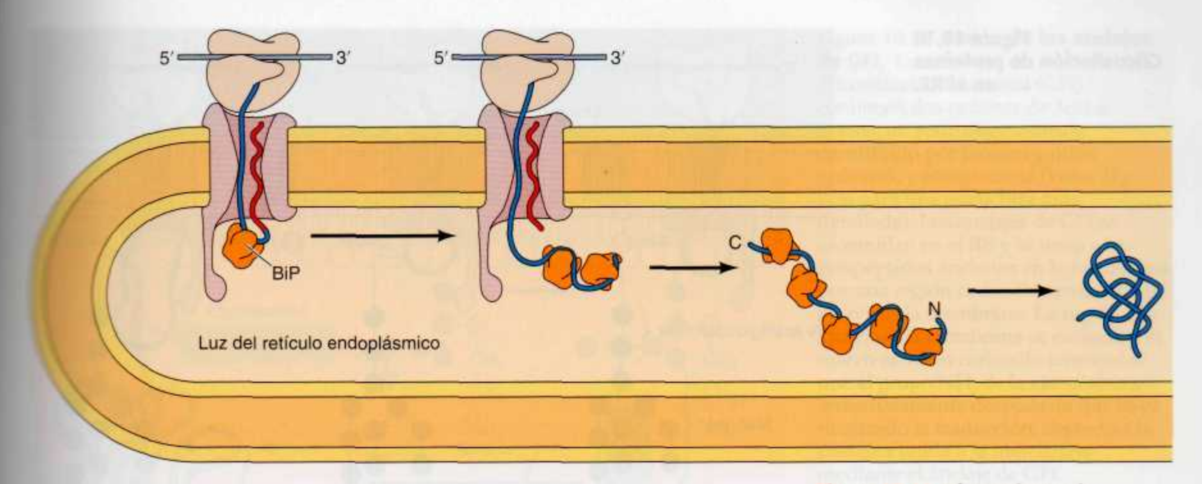


Figura 10.15 Plegamiento de proteínas en el RE. La chaperona molecular *BiP* se une a las cadenas polipeptídicas cuando atraviesan la membrana del RE y favorece el plegamiento y el ensamblaje de proteínas en el RE.

tica del péptido secuencia señal a medida que la cadena polipeptídica se transloca a través de la membrana del RE. El RE es también el sitio donde tiene lugar el plegamiento de las proteínas, el ensamblaje de proteínas de varias subunidades, la formación de los puentes disulfuro, las primeras etapas de la glicosilación, y la adición de anclajes de glicolípidos a algunas proteínas de la membrana plasmática. De hecho, el papel principal de las proteínas de la luz del RE es catalizar el plegamiento y ensamblaje de los polipéptidos recién translocados.

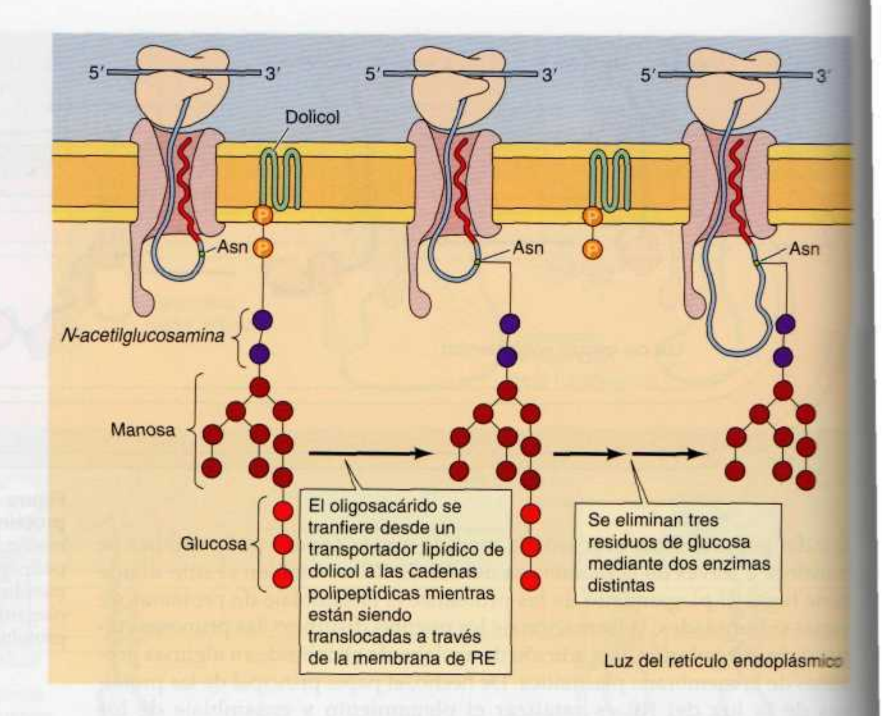
Como ya se ha dicho, las proteínas se translocan a través de la membrana del RE a modo de cadenas polipeptídicas sin plegar mientras prosigue su traducción. Por tanto, estos polipéptidos se pliegan en su conformación tridimensional en el RE, asistidos por las chaperonas moleculares que facilitan el plegamiento de las cadenas polipeptídicas (véase Cap. 8). Se cree que la chaperona Hsp70, BiP, se une a la cadena polipeptídica si...

mbrana, y después media el plegamiento proteico y el ensamteínas con múltiples subunidades, en el interior del RE (Fig. proteínas correctamente ensambladas son liberadas de BiP y ronas, y así están disponibles para su transporte al aparato de roteínas plegadas de forma anómala o incorrectamente ensamianas de degradación, como se estudia más adelante.

ción de puentes disulfuro entre las cadenas laterales de los resieína es un aspecto importante del plegamiento y ensamblaje el RE. Estos puentes no suelen formarse en el citosol, que se ca- r ser un ambiente reductor que mantiene la mayoría de los resieína en su estado reducido (—SH). En el RE, sin embargo, un idante promueve la formación de puentes disulfuro (S—S), y disulfuro formados en el RE desempeñan un papel importante ura de las proteínas secretadas y de la superficie celular. La foros puentes disulfuro está favorecida por la enzima **proteína dinerasa** (véase Fig. 8.25) que se localiza en la luz del RE.

ínas también son glicosiladas en residuos específicos de asparraosilación), en el RE, mientras se están traduciendo (Fig. 10.16). o en el Capítulo 8 (véanse Figs. 8.30 y 8.31), se añaden unidades ridos constituidas por 14 residuos de azúcar a los residuos de de las cadenas polipeptídicas en crecimiento, mientras están locadas al RE. El oligosacárido se sintetiza en un transportador licol) anclado en la membrana del RE. Después se transfiere nidad a los residuos de asparragina aceptores en la secuencia

Figura 10.16 Glicosilación de proteínas en el RE.



consenso Asn-X-Ser/Thr mediante una enzima unida a la membrana denominada oligosacaril transferasa. Tres residuos de glucosa son eliminados mientas que la proteína permanece en el RE, y la proteína se modifica aún más tras ser transportada al aparato de Golgi (analizado más adelante en este capítulo). La glicosilación ayuda a evitar la agregación de proteínas en el RE y añade señales para su ulterior distribución en la vía secretoria.

Algunas proteínas se anclan a la membrana plasmática mediante glicolípidos en lugar de mediante regiones de la cadena polipeptídica que atraviesan la membrana. Debido a que estos glicolípidos anclados a la membrana contienen fosfatidilinositol, se denominan **anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GFI)** cuya estructura se muestra en la Figura 8.36. Los anclajes de GFI se ensamblan en la membrana del RE. Se unen inmediatamente después de completarse la síntesis de las proteínas, al residuo carboxilo terminal de algunas proteínas ancladas en la membrana por una secuencia hidrofóbica C-terminal (Fig. 10.17). La secuencia C-terminal de la proteína es escindida e intercambiada por el ancla GPI, por lo que estas proteínas permanecen unidas a la membrana sólo a través del glicolípido. Al igual que las proteínas transmembrana, son transportadas a la superficie celular como componentes de la membrana a través de la vía secretora. Su orientación en el RE determina que las proteínas ancladas al GFI sean expuestas hacia el exterior de la célula, permaneciendo unidas a la membrana a través del anclaje de GFI.

Control de calidad en el RE

Muchas de las proteínas sintetizadas en el RE son rápidamente degradadas, principalmente porque no se pliegan correctamente; otras residen en el RE durante varias horas mientras que son plegadas correctamente. Así, un papel importante del RE es identificar las proteínas mal plegadas, marcarlas y dirigirlas a una vía de degradación. Puesto que asisten al correcto plegamiento de las proteínas, las chaperonas y las enzimas del procesamiento

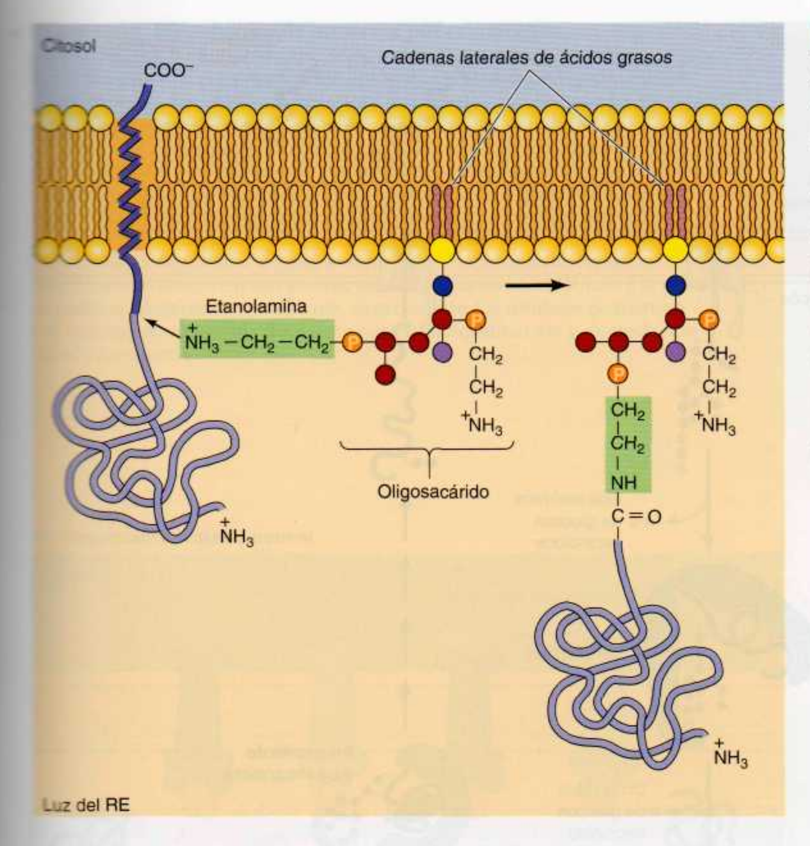
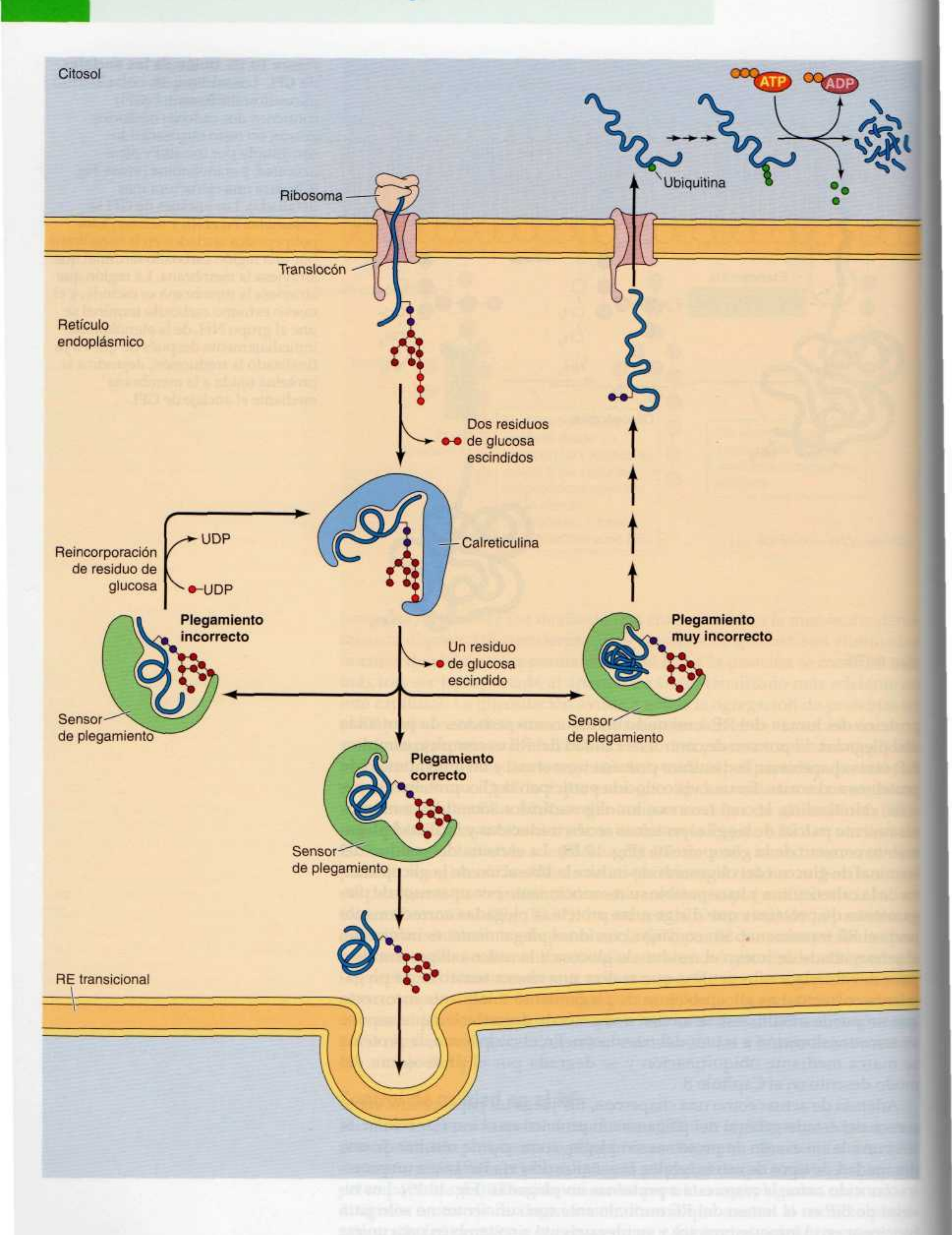


Figura 10.17 Unión de los anclajes de GFI. Los anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GFI) contienen dos cadenas de ácidos grasos, un resto oligosacárido constituido por inositol y otros azúcares, y etanolamina (véase Fig. 8.36 para una estructura más detallada). Los anclajes de GFI se ensamblan en el RE y se unen a los polipéptidos anclados en la membrana por una región carboxilo terminal que atraviesa la membrana. La región que atraviesa la membrana se escinde, y el nuevo extremo carboxilo terminal se une al grupo NH_2 de la etanolamina inmediatamente después de que haya finalizado la traducción, dejando a la proteína unida a la membrana mediante el anclaje de GFI.

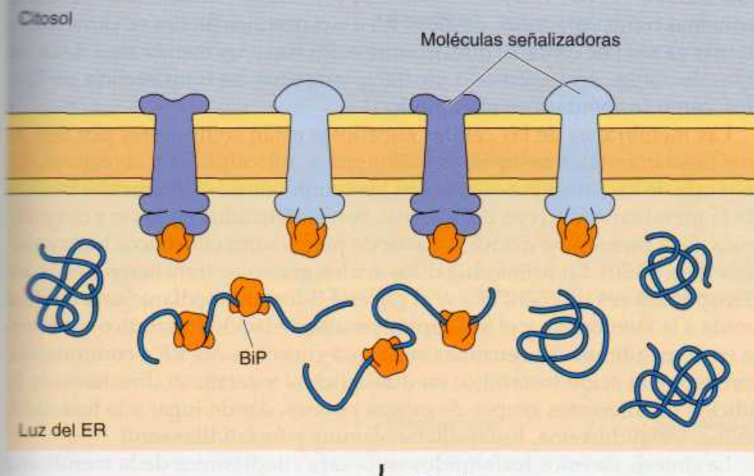
proteico del lumen del RE a menudo actúan como sensores de proteínas mal plegadas. El proceso de control de calidad del RE es complejo e implica BiP, otras chaperonas, la disulfuro proteína isomerasa, y un gran número de proteínas accesorias. En una vía conocida participan la glicoproteína chaperona, calreticulina, la cual reconoce los oligosacáridos sometidos a un procesamiento parcial de las glicoproteínas recién traducidas y facilita el plegamiento correcto de la glicoproteína (Fig. 10.18). La escisión del residuo del terminal de glucosa del oligosacárido induce la liberación de la glicoproteína de la calreticulina y hace posible su reconocimiento por un sensor de plegamiento de proteínas que dirige a las proteínas plegadas correctamente hacia el RE transicional. Sin embargo, cuando el plegamiento es incorrecto, el sensor añade de nuevo el residuo de glucosa a la cadena oligosacarídica para devolverla a calreticulina que realiza una nueva tentativa de plegamiento correcto. Las glicoproteínas de plegamiento totalmente incorrecto que no puede modificarse se envían a una vía de degradación que supone su retrotranslocación a través del translocón. En el citoplasma, la proteína se marca mediante ubiquitinación y se degrada por el proteosoma del modo descrito en el Capítulo 8.

Además de actuar como una chaperona, BiP juega un papel central como sensor del estado general del plegamiento proteico en el interior celular. Si se acumula un exceso de proteínas sin plegar, como puede resultar de una diversidad de tipos de estrés celular, la señalización vía BiP inicia un proceso conocido como la **respuesta a proteínas no plegadas** (Fig. 10.19). Los niveles de BiP en el lumen del RE normalmente son suficientes no sólo para funcionar en el importe proteico y su plegamiento sino también para unirse



Citosol
ATP
ADP
Ubiquitina
Ribosoma
Translocón
Retículo endoplásmico
Dos residuos de glucosa escindidos
Reincorporación de residuo de glucosa
UDP
UDP
Calreticulina
Plegamiento incorrecto
Plegamiento muy incorrecto
Un residuo de glucosa escindido
Sensor de plegamiento
Sensor de plegamiento
Plegamiento correcto
Sensor de plegamiento
RE transicional

Figura 10.18 Plegamiento de proteínas por calreticulina. Durante su salida a través del canal del translocón, se escinden dos residuos de glucosa de la glicoproteína para permitir la unión de la calreticulina que facilitará el plegamiento. La escisión del restante residuo de glucosa pone punto final a la interacción con la calreticulina y la glicoproteína para liberar a estas últimas. Un sensor de plegamiento de proteínas valora las regiones hidrofóbicas expuestas con el fin de evaluar el grado de plegamiento de la glicoproteína. La ausencia de estas regiones implica el plegamiento correcto de la proteína, que se dirige al RE transicional. Si el plegamiento de la glicoproteína fuera incorrecto, el sensor, que posee actividad glucosiltransferasa, añadirá de nuevo un residuo de glucosa para que la glicoproteína regrese al ciclo de la chaperona calreticulina. Si el sensor detectara un número excesivamente alto de regiones hidrofóbicas y la proteína no pudiera plegarse correctamente, se escindirán los residuos de manosa y se remitirá de nuevo al citoplasma para su ubiquitinación y degradación por el proteasoma.



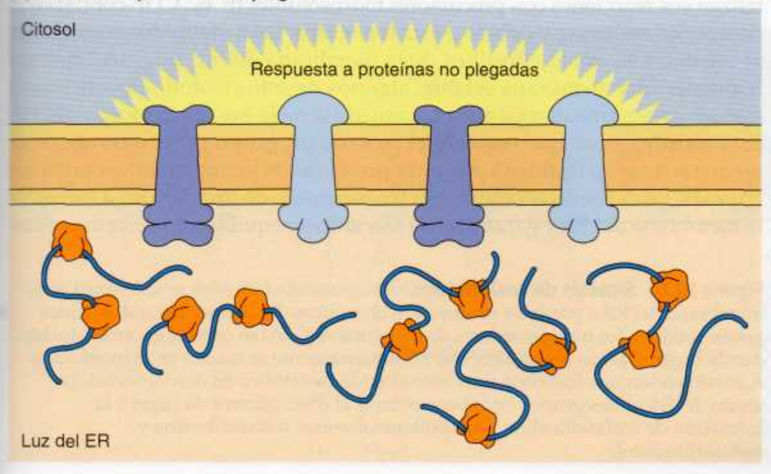


Figura 10.19 Respuesta a proteínas no plegadas. La proteína chaperona, BiP, participa en el plegamiento de las proteínas en la luz del RE. (A) En una célula no sometida a estrés hay suficiente BiP disponible para plegar las proteínas recién sintetizadas y para mantener varios tipos de moléculas señalizadoras de la membrana del RE inactivas. (B) El estrés celular, como el calor, el insulto químico o la infección vírica interfiere con el plegamiento proteico, de forma que se acumulan proteínas no plegadas en el RE. El BiP posee una mayor afinidad por las proteínas no plegadas que por las moléculas de membrana señalizadoras del RE, de modo que éstas son liberadas y se vuelven activas e inician la respuesta a proteínas no plegadas.

a moléculas señalizadoras y mantenerlas en un estado inactivo. Sin embargo, si se acumula un exceso de proteínas sin plegar, compiten por el BiP disponible. Esto produce la liberación de las moléculas que señalizan la respuesta a proteínas no plegadas, que incluye una inhibición general de la síntesis proteica, un incremento de la expresión de chaperonas (como calreticulina, disulfuro proteína isomerasa y del propio BiP) y un aumento de la degradación de ARNm que codifican proteínas de la vía secretoria. Estos aumentos se siguen de un aumento de la actividad del proteosoma para favorecer la degradación de las proteínas mal plegadas (véase Fig. 10.18) y, en caso que estas medidas fueran insuficientes, la inducción de la muerte celular programada o apoptosis (véase Cap. 17).

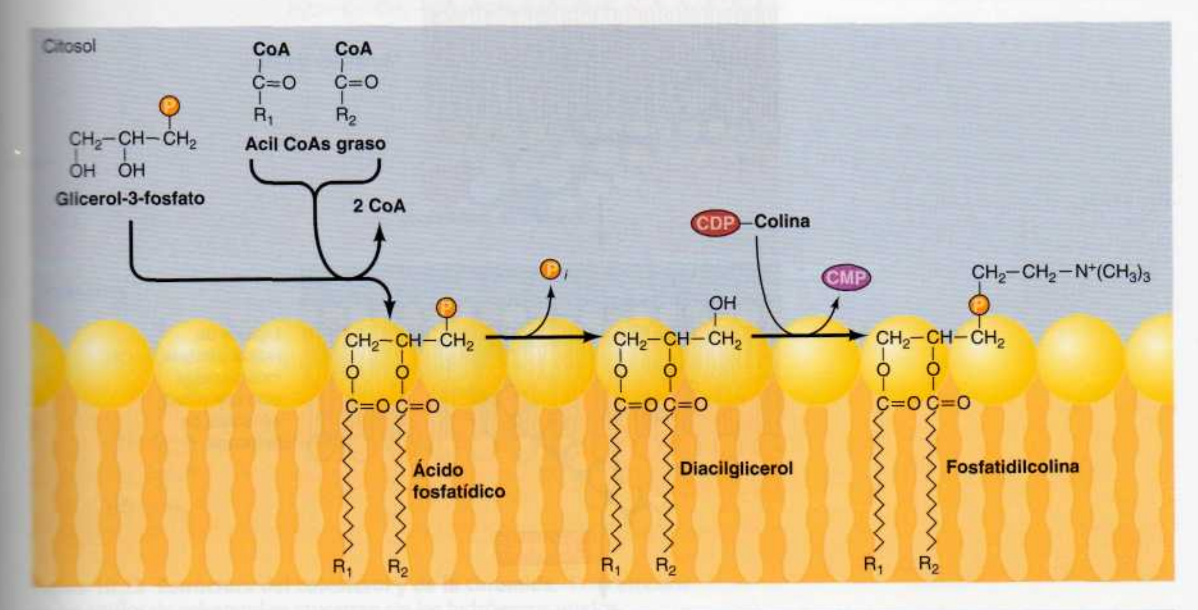
RE liso y síntesis de lípidos

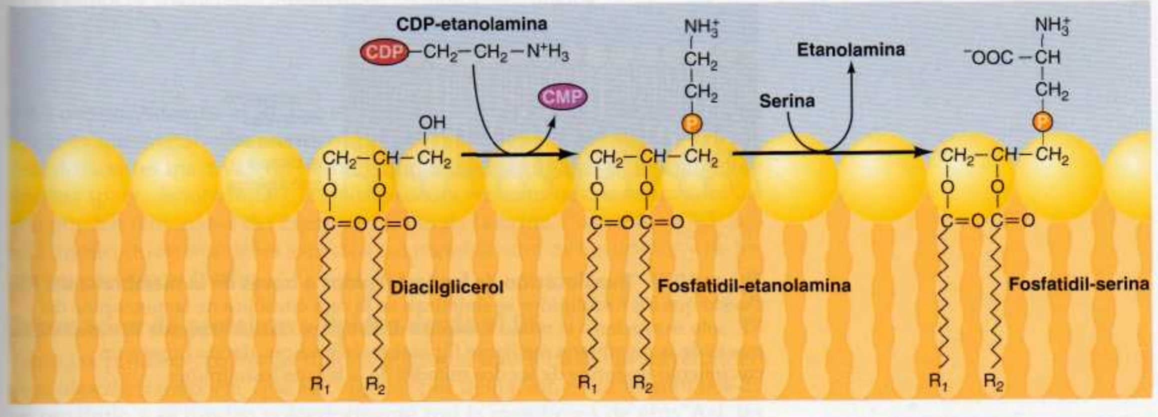
Además de su actividad en el procesamiento de las proteínas secretadas y de membrana, el RE es el sitio principal en el que se sintetizan los lípidos de la membrana en las células eucariotas. Puesto que son extremadamente hidrófobos, los lípidos se sintetizan asociados con membranas celulares ya existentes, en lugar de hacerlo en el ambiente acuoso del citosol. Aunque algunos lípidos se sintetizan asociados con otras membranas, la mayoría se sintetizan en el RE. Después son transportados, en vesículas o mediante proteínas transportadoras, desde el RE a sus destinos finales en otras membranas ya sea por contacto directo entre el RE liso y las membranas de la red *trans* del Golgi, en vesículas o mediante proteínas de transferencia de lípidos, como se abordará en el Capítulo 11.

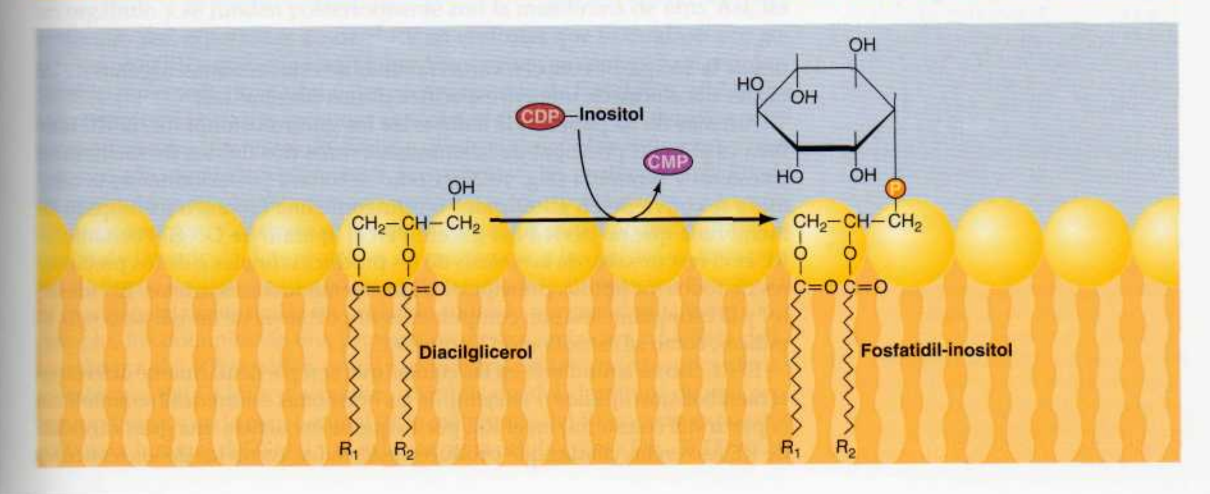
Las membranas de las células eucariotas están compuestas por tres tipos fundamentales de lípidos: fosfolípidos, glicolípidos y colesterol. La mayoría de los fosfolípidos, que son los componentes estructurales básicos de la membrana, derivan del glicerol. Son sintetizados en la cara citoplásmica de la membrana del RE, a partir de precursores citosólicos hidrosolubles (Fig. 10.20). En primer lugar los ácidos grasos se transfieren desde los transportadores de coenzima A al glicerol-3-fosfato mediante una enzima unida a la membrana, y el fosfolípido resultante (ácido fosfatídico) se inserta en la membrana. Las enzimas en la cara citosólica del RE a continuación convierten el ácido fosfatídico en diacilglicerol y catalizan directamente la adición de diferentes grupos de cabeza polares, dando lugar a la fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol.

La síntesis de estos fosfolípidos en la cara citoplásmica de la membrana del RE permite que las cadenas hidrófobas de los ácidos grasos permanezcan ocultas en la membrana mientras que las enzimas unidas a la membrana catalizan sus reacciones con precursores hidrosolubles (p. ej., CDP-colina) en el citosol. Sin embargo, y debido a esta topografía, los fosfolípidos nuevos sólo se añaden a la mitad citosólica de la membrana del RE (Fig. 10.21). Para mantener una membrana estable, algunos de estos fosfolípidos de nueva síntesis deben transferirse a la otra mitad (la de la luz) de la bicapa del RE. Esta transferencia, que requiere el paso de un grupo polar a través de la membrana, se ve facilitada por unas proteínas de membrana denominadas **flipasas.** Estas enzimas catalizan la translocación de fosfolípidos a través de la membrana del RE y garantizan el crecimiento equilibrado de ambas mita-

Figura 10.20 Síntesis de fosfolípidos. Los glicerofosfolípidos se sintetizan en la membrana del RE a partir de precursores citosólicos. En primer lugar dos ácidos grasos unidos a los transportadores de coenzima A (CoA) se unen al glicerol-3-fosfato, dando lugar al ácido fosfatídico, que simultáneamente se inserta en la membrana. A continuación una fosfatasa convierte el ácido fosfatídico en diacilglicerol. La unión de diferentes grupos de cabeza polares al diacilglicerol da lugar a la formación de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol.


Citosol
CoA
C=O
R1
CoA
C=O
R2
Acil CoAs graso
CH2–CH–CH2
OH OH
Glicerol-3-fosfato
2 CoA
Pi
CDP–Colina
CMP
CH2–CH2–N+(CH3)3
OH
CH2–CH–CH2
O O
C=O C=O
R1 R2
Ácido fosfatídico
Diacilglicerol
Fosfatidilcolina


CDP-etanolamina
CDP–CH2–CH2–N+H3
CMP
NH3+
CH2
CH2
Etanolamina
Serina
-OOC–CH
CH2
OH
CH2–CH–CH2
O O
C=O C=O
R1 R2
Diacilglicerol
Fosfatidil-etanolamina
Fosfatidil-serina


CDP–Inositol
CMP
OH
HO
OH
HO
OH
CH2–CH–CH2
O O
C=O C=O
R1 R2
Diacilglicerol
Fosfatidil-inositol

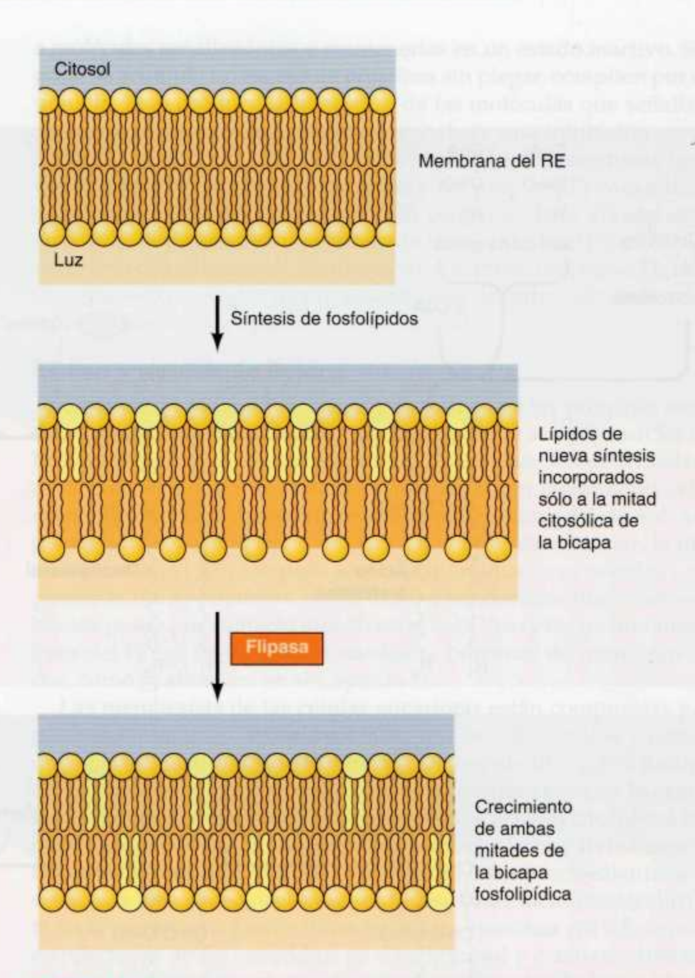


Figura 10.21 Translocación de los fosfolípidos a través de la membrana del RE. Puesto que los fosfolípidos se sintetizan en la cara citosólica de la membrana del RE, sólo se añaden a la mitad citosólica de la bicapa. Posteriormente se translocan a través de la membrana mediante flipasas fosfolipídicas, dando lugar a un crecimiento uniforme de las dos mitades de la bicapa fosfolipídica.

des de la bicapa. Se conocen varias familias de estas enzimas, algunas de las cuales translocan de manera específica ciertos fosfolípidos.

Además de su papel en la síntesis de los glicerofosfolípidos, el RE también es el lugar principal de la síntesis de otros dos lípidos de membrana: colesterol y ceramida (Fig. 10.22). Como se tratará posteriormente, la ceramida se convierte en glicolípidos o esfingomielina (el único fosfolípido de membrana que no deriva del glicerol) en el aparato de Golgi. Por tanto, el RE es el responsable de la síntesis de los productos finales o de los precursores de todos los lípidos principales de las membranas eucariotas. El colesterol y la esfingomielina son componentes importantes de las balsas o *rafts* lipídicas, como se estudia en el Capítulo 13.

El RE liso es abundante en las células que son particularmente activas en el metabolismo lipídico. Por ejemplo, las hormonas esteroideas se sintetizan (a partir del colesterol) en el RE, por lo que se encuentra una gran cantidad de RE liso en las células que producen esteroides, como las de los testículos

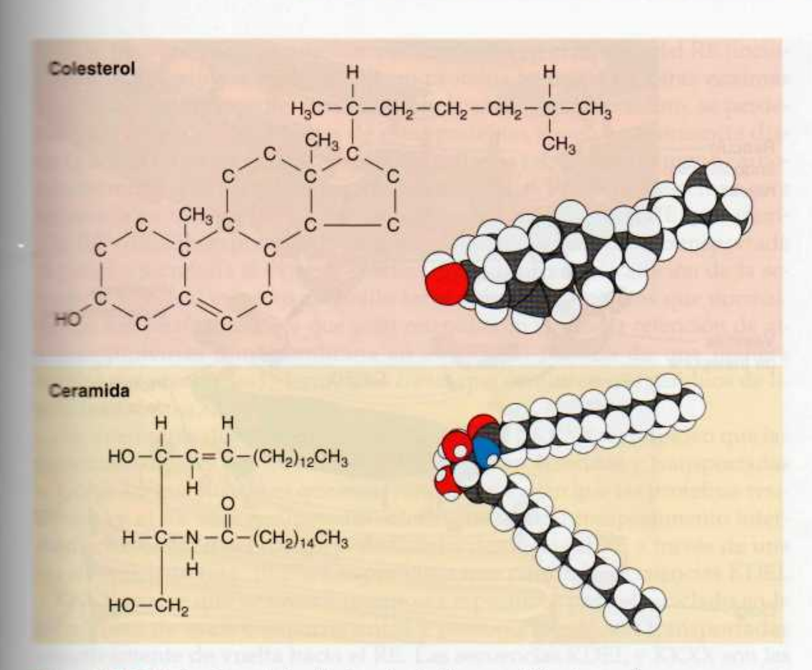


Figura 10.22 Estructura del colesterol y de la ceramida. Los carbonos de los anillos de colesterol se muestran sin los hidrógenos unidos.

y del ovario. Además, el RE liso es abundante en el hígado, donde contiene enzimas que metabolizan varios compuestos liposolubles. Estas enzimas desintoxicantes inactivan un número importante de drogas potencialmente nocivas (p. ej., fenobarbital), convirtiéndolas en compuestos hidrosolubles que pueden eliminarse del cuerpo a través de la orina. Por tanto, el RE liso está implicado en múltiples aspectos del metabolismo de los lípidos y de los compuestos liposolubles.

Exportación de proteínas y lípidos desde el RE

Tanto las proteínas como los lípidos migran a través de la vía secretora en vesículas de transporte, que se originan por gemación en la membrana de un orgánulo y se funden posteriormente con la membrana de otro. Así, las moléculas son exportadas desde el RE en vesículas que se originan por gemación en el RE y que, en primer lugar, transportan su contenido al compartimento intermedio RE-Golgi y después al aparato de Golgi (Fig. 10.23). Pasos posteriores en la vía secretora suponen el transporte de vesículas entre compartimentos diferentes del Golgi y desde el Golgi a los endosomas, lisosomas o a la membrana plasmática. En cada caso, las proteínas en la luz de un orgánulo se empaquetan en una vesícula de transporte que se va a escindir por gemación, y después se liberan en la luz del orgánulo receptor tras la fusión de la vesícula. Las proteínas de membrana y los lípidos se transportan de forma similar, y es digno de mencionar que su orientación topológica se mantiene al viajar desde un orgánulo rodeado por membrana a otro. Por ejemplo, los dominios de una proteína expuestos en la cara citosólica de la membrana del RE también estarán expuestos en la cara citosólica de las membranas del Golgi y plasmática, mientras que los dominios de una proteína expuestos en la cara luminal de la membrana del RE estarán expuestos en la cara luminal del Golgi y al exterior de la célula (véase Fig. 10.11).

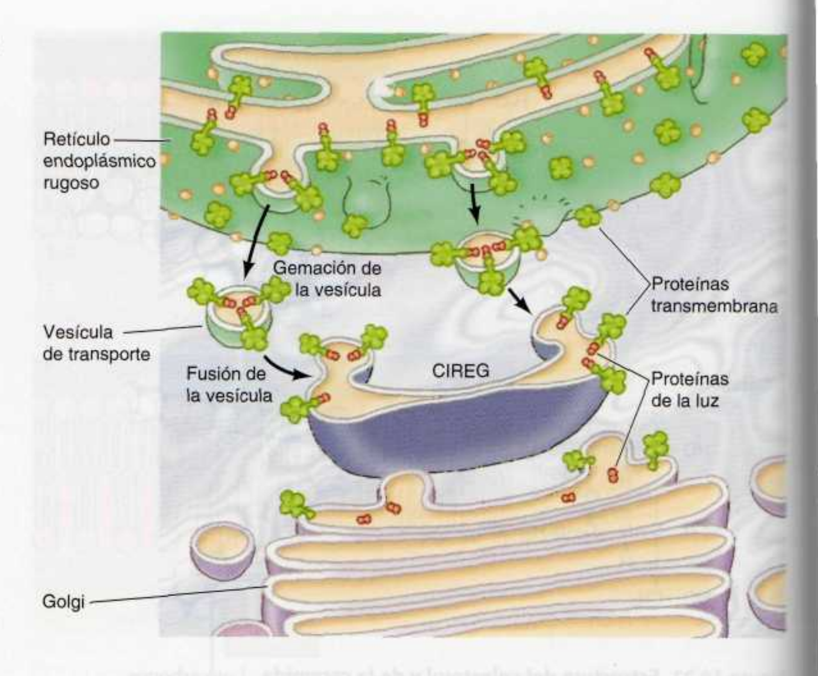


Figura 10.23 Transporte de vesículas desde el RE hasta el Golgi. Las proteínas y los lípidos se transportan desde el RE hasta el Golgi en vesículas de transporte que se originan por gemación de la membrana del RE y después se fusionan para formar las vesículas y los túbulos del compartimento intermedio RE-Golgi (CIREG). Las proteínas luminales del RE son captadas por las vesículas y liberadas en la luz del Golgi. Las proteínas de membrana mantienen la misma orientación en el Golgi que en el RE.

La mayoría de las proteínas que entran en el RE transicional (el primer punto de ramificación de la vía secretora) se mueven a través del compartimento intermedio RE-Golgi hacia el Golgi. Estas proteínas están marcadas por secuencias que señalizan su exporte o su retención en el RE (Fig. 10.24). Muchas proteínas transmembrana poseen secuencias aminoacídicas diacídicas o di-hidrofóbicas en sus dominios citosólicos que funcionan como señales de exporte del RE. Tanto las proteínas ancladas a GFI (que están marcadas para su exporte por parte de sus anclas GFI) como las proteínas secretoras de la luz parecen ser reconocidas y secuestradas por estas proteínas receptoras transmembrana. Muy pocas señales de exporte del RE han sido detectadas en proteínas secretoras de la luz y su reconocimiento por los receptores de transporte transmembrana puede depender de la morfología de la proteína de plegamiento correcto. También es posible que exista una vía por la que a través de proteínas sin ninguna otra marca presentes en la luz del RE se trasladan por defecto al Golgi y más allá.

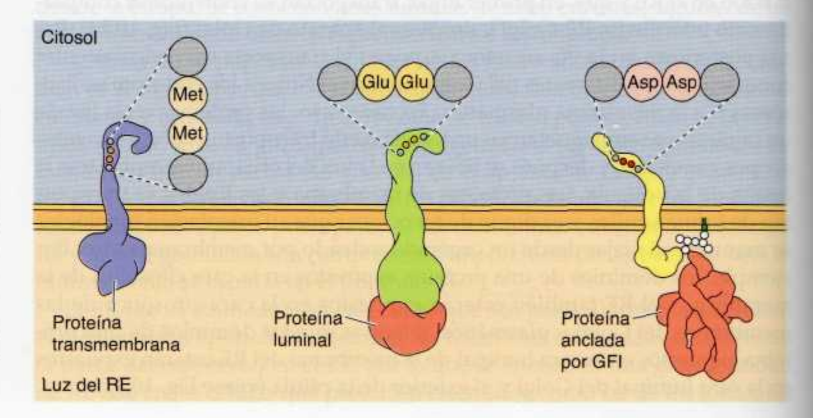


Figura 10.24 Señales de exporte desde el RE. Las proteínas que se transportan desde el RE al aparato de Golgi se marcan con señales de exportación que inducen su incorporación a vesículas que salen por gemación del RE transicional. Las proteínas transmembrana son reconocidas por secuencias señal diacídicas (por ejemplo, Asp-Asp o Glu-Glu) o di-hidrofóbicas (por ejemplo, Met-Met) presentes en sus segmentos citosólicos. Algunas de estas proteínas transmembrana actúan como receptores de proteínas ancladas por GPI que son reconocidas por esta molécula y por proteínas de la luz capaces de identificar secuencias señal o zonas señal presentes en las proteínas plegadas.

Si se permite que las proteínas que funcionan en el interior del RE (incluyendo BiP, peptidasa señal, disulfuro proteína isomerasa y otras enzimas analizadas anteriormente) procedan a lo largo de la vía secretora, se perderían para la célula. Así, muchas de estas proteínas tienen una secuencia diana Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL, en el código de una letra) en su extremo carboxilo terminal que dirige su recuperación hacia el RE. Si se deleciona esta secuencia en una proteína que normalmente funciona en el RE (por ejemplo, BiP o disulfuro proteína isomerasa), la proteína mutada es transportada al Golgi y secretada al exterior celular. Por el contrario, la adición de la secuencia KDEL al extremo carboxilo terminal de las proteínas que normalmente son secretadas hace que sean retenidas en el RE. La retención de algunas proteínas transmembrana en el RE está dictada de una manera similar por secuencias C-terminales cortas que contienen dos residuos de lisina (secuencias KKXX).

Es interesante destacar que las señales KDEL y KKXX no impiden que las proteínas solubles del RE sean empaquetadas en vesículas y transportadas al Golgi. Lo que sucede es que estas señales provocan que las proteínas residentes en el RE sean recuperadas selectivamente del compartimento intermedio RE-Golgi o del complejo de Golgi y devueltas al RE a través de una vía de reciclado (Fig. 10.25). Las proteínas que portan las secuencias KDEL y KKXX parece que se unen a receptores específicos para el reciclado en la membrana de estos compartimentos y posteriormente son transportadas selectivamente de vuelta hacia el RE. Las secuencias KDEL y KKXX son las señales de retención/recuperación mejor caracterizadas, pero pueden existir otras. Otras proteínas son recuperadas porque se unen específicamente a proteínas que contienen la secuencia KDEL como BiP. Así, el movimiento continuado a lo largo de la vía secretora o su recuperación del Golgi al RE, constituye el segundo punto de ramificación con el que se encuentran las proteínas cuando están siendo organizadas en sus destinos correctos. Puntos de ramificación similares surgen en cada estadio subsiguiente del transpor-

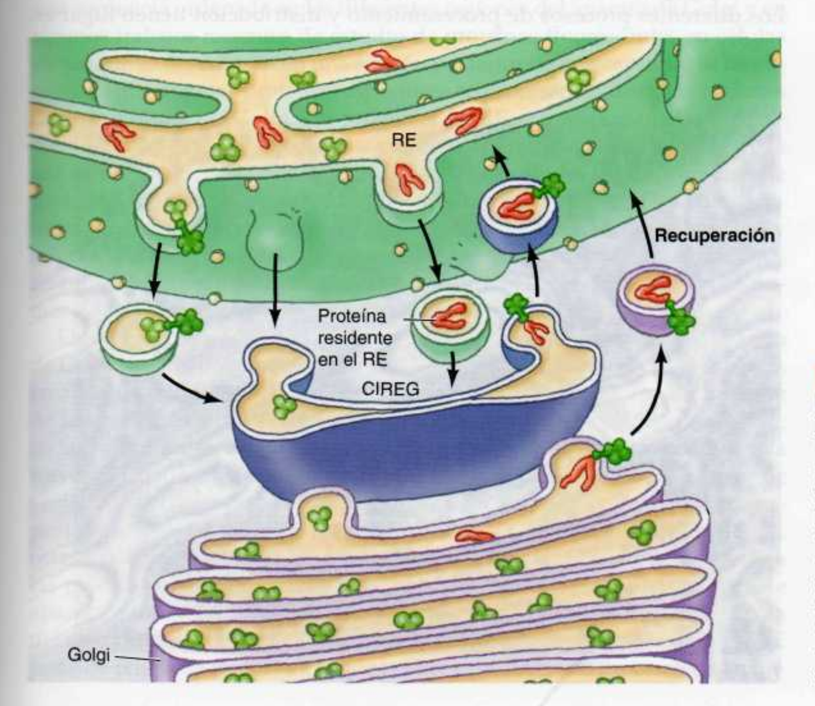


Figura 10.25 Recuperación de las proteínas residentes en el RE. Las proteínas destinadas a permanecer en la luz del RE se encuentran marcadas por secuencias de recuperación en su extremo carboxilo terminal. Estas proteínas son exportadas desde el RE al Golgi por el flujo masivo no selectivo de proteínas a través de la vía secretora, pero son reconocidas por un receptor en el compartimento intermedio RE-Golgi (CIREG) o en el aparato de Golgi y son devueltas selectivamente al RE.

te, como la retención en el Golgi frente a su exporte a endosomas, a los lisosomas o la membrana plasmática. En cada caso, señales de localización específicas dirigen a las proteínas a sus correspondientes destinos intracelulares correctos.

Aparato de Golgi

El **aparato de Golgi, o el complejo de Golgi,** funciona como una fábrica en la que las proteínas recibidas desde el RE se reprocesan y distribuyen para ser transportadas a sus destinos finales: los lisosomas, la membrana plasmática o la secreción. Además, como ya se ha mencionado, los glicolípidos y la esfingomielina son sintetizados en el Golgi. En las células vegetales, el aparato de Golgi, además, es el sitio en el que se sintetizan los polisacáridos complejos de la pared celular. Así, el aparato de Golgi está implicado en procesar el amplio espectro de constituyentes celulares que viajan a lo largo de la vía secretora.

Organización del Golgi

En la mayoría de las células, el Golgi está compuesto por unas bolsas aplanadas, rodeadas de membrana (cisternas) y por vesículas asociadas (Fig. 10.26). Un aspecto llamativo del aparato de Golgi es su polaridad tanto en la estructura como en la función. Las proteínas procedentes del RE entran por su cara *cis* convexa (cara de entrada), y habitualmente se orienta hacia el núcleo. Entonces son transportadas a través del Golgi y salen por su cara cóncava *trans* (cara de salida). Según atraviesan el Golgi, las proteínas se modifican y se distribuyen para el transporte a sus destinos finales en la célula.

El aparato de Golgi consta de un gran número de compartimentos discretos, por lo que habitualmente se divide en cuatro regiones funcionales diferentes: la **red *cis* del Golgi**, el **apilamiento del Golgi** (que se divide en los subcompartimentos medial y *trans*) y la **red *trans* del Golgi** (Fig. 10.27). Los diferentes procesos de procesamiento y distribución tienen lugar en



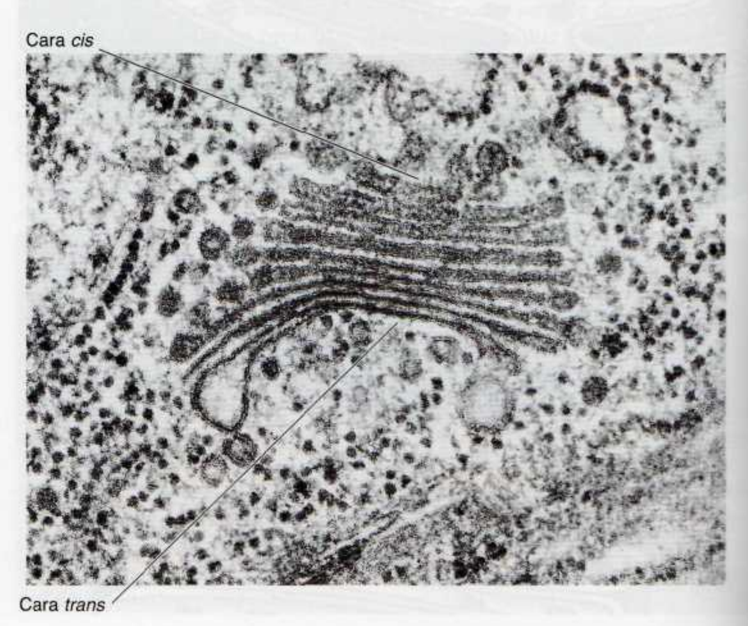


Figura 10.26 Microfotografía electrónica de un aparato de Golgi. El aparato de Golgi está constituido por una pila de cisternas aplanadas y vesículas asociadas. Las proteínas y lípidos procedentes del RE entran en el aparato de Golgi por su cara *cis* y salen por su cara *trans*. (Cortesía del Dr L. Andrew Staehelin, Universidad de Colorado en Boubler.)

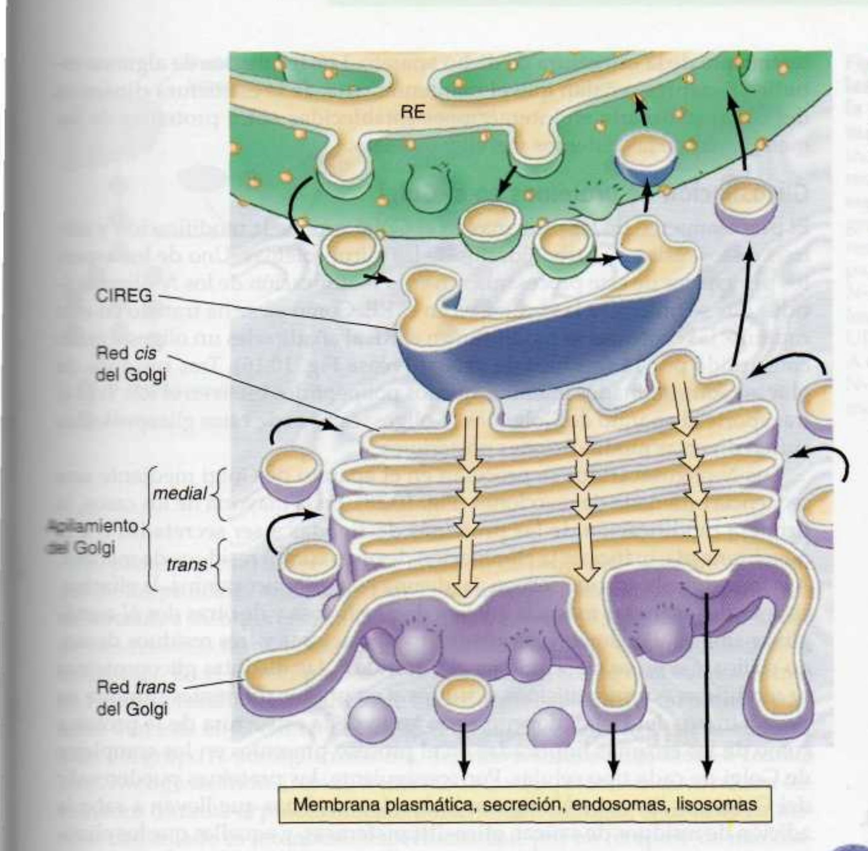


Figura 10.27 Regiones del aparato de Golgi. Las vesículas procedentes del RE se fusionan para formar el compartimento intermedio RE-Golgi (CIREG), y entonces las proteínas del RE se transportan a la red *cis* del Golgi. Las proteínas residentes en el RE son devueltas desde el compartimento intermedio RE-Golgi y desde la red *cis* del Golgi a través de la vía de reciclaje. Los compartimentos *medial* y *trans* del apilamiento del Golgi se corresponden con las cisternas de la porción medial del complejo de Golgi y son los lugares donde se producen la mayoría de las modificaciones de las proteínas. Las proteínas se transportan después a la red *trans* del Golgi, donde se distribuyen para el transporte a la membrana plasmática, para ser secretadas, o hacia los lisosomas. Las proteínas atraviesan el aparato de Golgi en dirección *cis-trans* en el interior de las cisternas de Golgi, mientras que las vesículas de transporte se ocupan de devolver las proteínas residentes del Golgi a los compartimentos iniciales de este aparato para su reutilización.

10.2 Animación web

La organizacion del Golgi

El aparato de Golgi está compuesto por sacos aplastados encerrados por membranas que reciben proteínas del RE, las procesan y las dirigen a sus eventuales destinos.

una secuencia ordenada en las diferentes regiones del aparato de Golgi y en algunos trabajos recientes de estudio de proteínas fluorescentes en células vivas (que se describirán en una sección posterior de este capítulo) se ha observado que algunas proteínas específicas se procesan en distintas regiones de cada cisterna del Golgi. Las proteínas del RE se transportan al compartimento intermedio del Golgi-RE y pasan al aparato de Golgi a través de la red *cis* del Golgi, *en la que se comienzan las reacciones de modificación* de proteínas, lípidos y polisacáridos. Posteriormente atraviesan los compartimentos medial y *trans* en los que son sometidos a nuevas modificaciones y migran a la red *trans* del Golgi, que actúa como un centro de organización y distribución que dirige el tráfico molecular hacia los endosomas, los lisosomas, la membrana plasmática o el exterior de la célula.

El mecanismo por el que las proteínas se desplazan a través del aparato de Golgi ha sido objeto de controversia durante muchos años. Sin embargo, en algunos estudios se han obtenido datos firmes que indican el transporte de las proteínas a través de los compartimentos de las cisternas del Golgi, en las que madurarían de manera gradual y migrarían de forma paulatina a través del aparato en dirección *cis-trans* en lugar de hacerlo en el interior de vesículas de transporte (véase Fig. 10.27). En lugar de ocuparse del transporte de proteínas a través del apilamiento del Golgi en dirección *cis-trans*, estas vesículas asociadas al aparato de Golgi se encargarían de devolver a las proteínas residentes del Golgi a los compartimentos iniciales de este aparato para su reutilización. La desaparición de la estructura organizada del aparato de Golgi cuando se inhibe el transporte de vesículas desde el RE pone de relieve la importancia que reviste este dinámico proceso en el man-

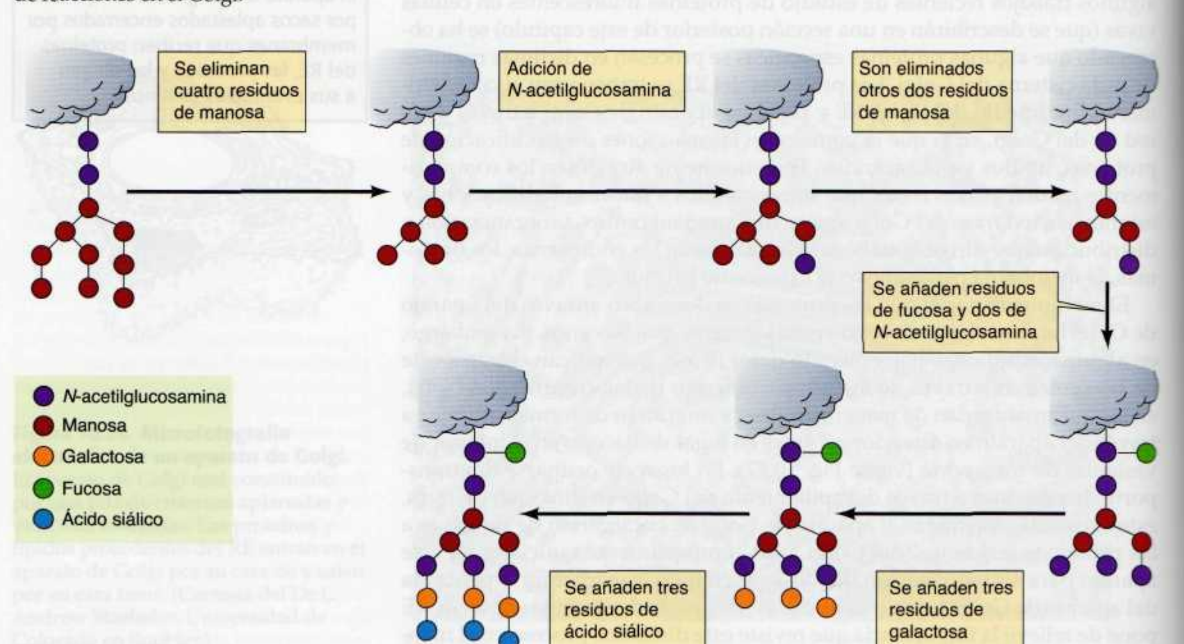
tenimiento de la estructura de dicho aparato. Los resultados de algunos estudios recientes señalan que el mantenimiento de la estructura dinámica del Golgi se basaría en interacciones establecidas entre proteínas de las membranas de las cisternas y el citoesqueleto.

Glicosilación de proteínas en el Golgi

El procesamiento de las proteínas en el Golgi supone la modificación y síntesis de los restos de carbohidratos de las glicoproteínas. Uno de los aspectos principales de este procesamiento es la modificación de los *N*-oligosacáridos que se unieron a las proteínas en el RE. Como ya se ha tratado en este capítulo, las proteínas se modifican en el RE al añadírseles un oligosacárido constituido por 14 residuos de azúcar (véase Fig. 10.16). Tres residuos de glucosa son eliminados mientras que los polipéptidos están en el RE. Tras el transporte al aparato de Golgi, los *N*-oligosacáridos de estas glicoproteínas sufren diversas modificaciones posteriores.

Los *N*-oligosacáridos se procesan en el aparato de Golgi mediante una secuencia ordenada de reacciones (Fig. 10.28). En la mayoría de los casos, la primera modificación de las proteínas destinadas a ser secretadas o a la membrana plasmática es la eliminación de otros cuatro residuos de manosa. A esto le sigue la adición secuencial de una *N*-acetilglucosamina, la eliminación de dos manosas más y la adición de una fucosa y de otras dos *N*-acetilglucosaminas. Finalmente, se añaden tres galactosas y tres residuos de ácido siálico. Como se mencionó en el Capítulo 8, las distintas glicoproteínas se modifican por mecanismos distintos y en grados diferentes durante su paso a través del Golgi, dependiendo tanto de la estructura de la proteína como de las enzimas implicadas en el proceso presentes en los complejos de Golgi de cada tipo celular. Por consiguiente, las proteínas pueden salir del Golgi con diversos *N*-oligosacáridos. Las enzimas que llevan a cabo la adición de residuos de azúcar, **glicosiltransferasas**, y aquellas que los eliminan, **glicosidasas**, están bien caracterizadas, pero la base de su localización en cisternas específicas del Golgi es desconocida.

Figura 10.28 Procesamiento de los *N*-oligosacáridos en el Golgi. Los *N*-oligosacáridos de las glicoproteínas transportadas desde el RE son modificados posteriormente mediante una secuencia ordenada de reacciones en el Golgi.



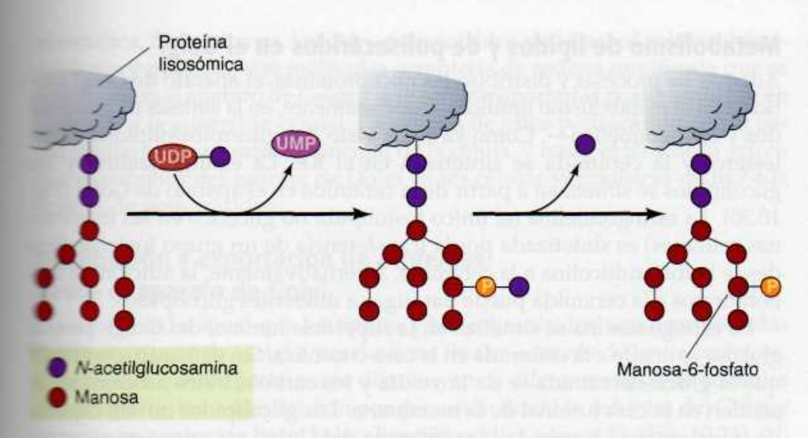


Figura 10.29 Marcaje y dirección de las proteínas lisosómicas mediante la fosforilación de los residuos de manosa. Las proteínas destinadas a incorporarse en los lisosomas son reconocidas y modificadas específicamente mediante la adición de grupos fosfato a la posición 6 de los residuos de manosa. En el primer paso de la reacción, los fosfatos de *N*-acetilglucosamina se transfieren a los residuos de manosa desde la UDP-*N* acetilglucosamina. A continuación se eliminan los grupos *N*-acetilglucosamina dando lugar a manosa-6-fosfato.

El procesamiento del *N*-oligosacárido de las proteínas lisosómicas difiere del de las proteínas secretadas y de la membrana plasmática. Las proteínas destinadas a incorporarse en los lisosomas, en vez de la eliminación inicial de tres residuos de manosa, son modificadas mediante una fosforilación de la manosa. En el primer paso de esta reacción, se añade *N*-acetilglucosamina fosfato a residuos específicos de manosa, probablemente mientras la proteína aún está en la red *cis* del Golgi (Fig. 10.29). A esto le sigue la eliminación del grupo *N*-acetilglucosamina, dejando residuos de **manosa-6-fosfato** en el *N*-oligosacárido. Debido a esta modificación, estos residuos no son eliminados durante el procesamiento posterior. En su lugar, el residuo de manosa fosforilado es reconocido específicamente por un receptor de manosa-6-fosfato en la red *trans* del Golgi, que dirige el transporte de estas proteínas a los lisosomas.

Por tanto, la fosforilación de los residuos de manosa es un paso crucial en la distribución de las proteínas lisosómicas hacia su destino intracelular correcto. La especifidad de este proceso reside en la enzima que cataliza el primer paso en la secuencia de la reacción —la adición selectiva de *N*-acetilglucosamina fosfato a las proteínas lisosómicas—. Esta enzima reconoce un determinante estructural que está presente en las proteínas lisosómicas pero no en las proteínas destinadas a la membrana plasmática o a la secreción. Este determinante de reconocimiento no es una simple secuencia de aminoácidos, sino que está constituido, en la proteína plegada, por la yuxtaposición de secuencias de aminoácidos de regiones diferentes de la cadena polipeptídica. A diferencia de las secuencias señal que dirigen la translocación de proteínas al RE, el determinante de reconocimiento que conduce a la fosforilación de la manosa —y que por tanto dirige finalmente las proteínas a los lisosomas—, depende de la conformación tridimensional de la proteína plegada. Estos determinantes se denominan **regiones señal**, a diferencia de las señales lineales tratadas previamente en este capítulo.

Las proteínas también pueden modificarse mediante la adición de carbohidratos a las cadenas laterales de residuos de serina y treonina que formen parte de secuencias específicas (*O*-glicosilación) (véase Fig. 8.32). Estas modificaciones tienen lugar en el aparato de Golgi mediante la adicion secuencial de residuos únicos de azúcar. La serina o la treonina se suelen unir directamente a la *N*-acetilgalactosamina, a la que después pueden añadirse otros azúcares. En algunos casos, estos azúcares sufren modificaciones posteriores por la adición de grupos sulfato.

Metabolismo de lípidos y de polisacáridos en el Golgi

Además de procesar y distribuir las glicoproteínas, el aparato de Golgi participa en el metabolismo lipídico —concretamente, en la síntesis de glicolípidos y esfingomielina—. Como ya se ha visto, los glicerofosfolípidos, el colesterol y la ceramida se sintetizan en el RE. La esfingomielina y los glicolípidos se sintetizan a partir de la ceramida en el aparato de Golgi (Fig. 10.30). La esfingomielina (el único fosfolípido no glicérico en las membranas celulares) es sintetizada por la transferencia de un grupo fosforilcolina desde la fosfatidilcolina a la ceramida. Alternativamente, la adición de carbohidratos a la ceramida puede dar lugar a diferentes glicolípidos.

La esfingomielina se sintetiza en la superficie luminal del Golgi, pero la glucosa se añade a la ceramida en la cara citosólica. Sin embargo, parece ser que la glucosilceramida se da la vuelta y los carbohidratos adicionales se añaden en la cara luminal de la membrana. Los glicolípidos no son capaces de translocarse a través de la membrana del Golgi, así que se encuentran solo en la mitad luminal de la bicapa del Golgi como la mayoría de la esfingomielina. Tras el transporte vesicular, se localizan en la cara externa de la membrana citoplasmática, con sus grupos de cabeza polares expuestos en la superficie celular. Como se verá en el Capítulo 13, los residuos de oligosacáridos de los glicolípidos son marcadores de superficie importantes en el reconocimiento célula-célula.

En las células vegetales, el aparato de Golgi tiene la función añadida de ser el lugar donde se sintetizan los polisacáridos complejos de la pared celular. Como se tratará con mayor detalle en el Capítulo 14, la pared celular vegetal está compuesta por tres tipos principales de polisacáridos. La celulosa, el constituyente predominante, es un polímero lineal de restos de glucosa. Es sintetizado en la superficie celular por enzimas de la membrana

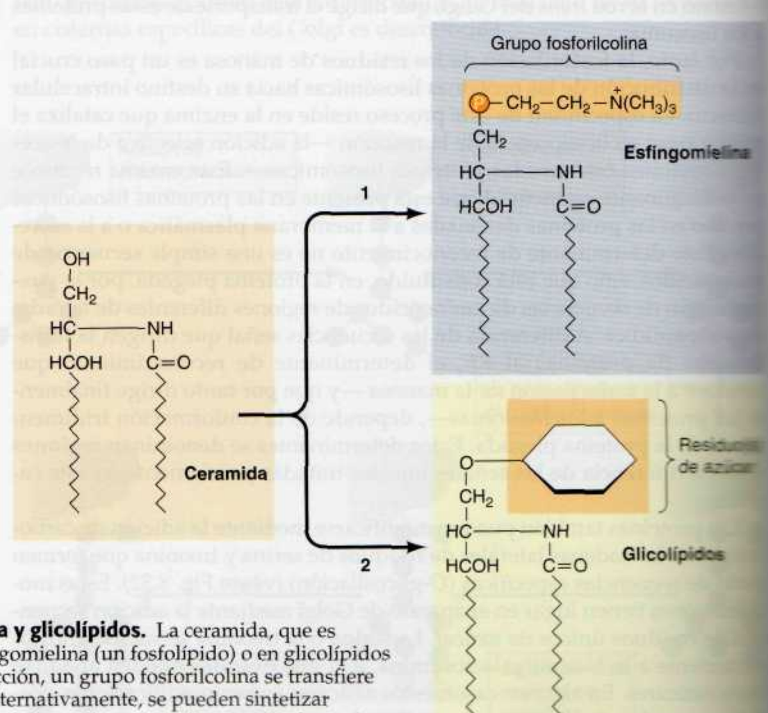


Figura 10.30 Síntesis de esfingomielina y glicolípidos. La ceramida, que es sintetizada en el RE, se convierte en esfingomielina (un fosfolípido) o en glicolípidos en el aparato de Golgi. En la primera reacción, un grupo fosforilcolina se transfiere desde la fosfatidilcolina a la ceramida. Alternativamente, se pueden sintetizar diferentes glicolípidos añadiéndose uno o más residuos de azúcar (p. ej., glucosa).

plasmática. Sin embargo, los otros polisacáridos de la pared celular (hemicelulosas y pectinas) son moléculas complejas de cadena ramificada que se sintetizan en el aparato de Golgi y que son transportadas posteriormente en vesículas a la superficie celular. La síntesis de estos polisacáridos de la pared celular es una función principal de la célula, y hasta el 80% de la actividad metabólica del aparato de Golgi en las células vegetales se dedica a la síntesis de polisacáridos.

Distribución y exportación de proteínas desde el aparato de Golgi

Las proteínas, al igual que los lípidos y los polisacáridos, son transportadas desde el aparato de Golgi a sus destinos finales a través de la vía secretora. Esto implica que las proteínas se distribuyan en diferentes tipos de vesículas de transporte, las cuales saldrán por gemación desde la red *trans* del Golgi y llevarán su contenido hasta la localización celular adecuada. (Fig. 10.31). Algunas proteínas se transportan desde el Golgi a la membrana plasmática, ya sea directamente o a través de endosomas de reciclaje como un compartimento intermedio. Otras proteínas se transportan a la superficie celular a través de una vía diferente de secreción regulada o bien se dirigen de manera específica a otros destinos celulares, como los endosomas tardíos y los lisosomas en las células animales o las vacuolas en las levaduras.

Las proteínas que realizan su función en el aparato de Golgi deben retenerse en ese orgánulo, en lugar de ser transportadas a través de la vía secretora. A diferencia del RE, todas las proteínas retenidas en el complejo de

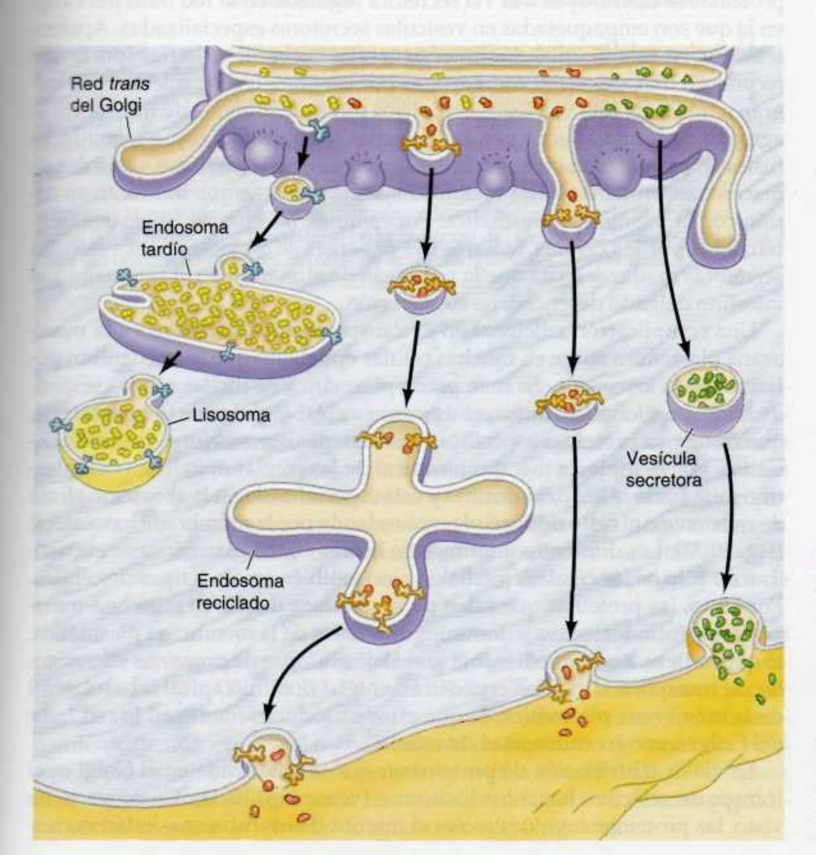


Figura 10.31 Transporte desde el aparato de Golgi. Las proteínas se distribuyen en la red *trans* del Golgi y se transportan en vesículas a sus destinos finales. Las proteínas se transportan a la membrana plasmática directamente o bien a través de endosomas de reciclaje. Por otra parte, las proteínas se distribuyen en distintas vesículas secretorias de secreción regulada. Asimismo, pueden dirigirse hacia los endosomas tardíos que darán lugar a lisosomas.

Golgi están asociadas con la membrana del Golgi en lugar de ser proteínas solubles en su interior. Las señales responsables para la retención de algunas proteínas en el Golgi se han localizado en sus dominios transmembrana, que retienen las proteínas en el aparato de Golgi impidiendo que sean empaquetadas en las vesículas de transporte que salen por la red *trans* del Golgi. Además, al igual que sucede con las secuencias KKXX de las proteínas de membrana residentes en el RE, las señales en las colas citoplásmicas de algunas proteínas del Golgi son responsables de la recuperación de estas proteínas desde compartimentos posteriores a lo largo de la vía secretora.

El transporte desde el aparato de Golgi hacia la superficie celular puede darse a través de, al menos, tres vías (véase Fig. 10.31). La vía más sencilla consiste en el transporte directo de la red *trans* del Golgi hacia la membrana plasmática, lo que supone la incorporación de nuevas proteínas y lípidos en dicha membrana y la secreción continua de proteínas celulares. Por otra parte, las proteínas pueden migrar del Golgi hacia la membrana plasmática a través de endosomas de reciclaje que actúan como intermediarios y representan uno de los tres tipos de endosomas caracterizados en las células animales (como se tratará en una sección ulterior de este capítulo).

Además de estas vías, que hacen posible una secreción proteica desrregulada continua, algunas células poseen una vía secretora regulada diferente de secreción de proteínas específicas como respuesta a señales ambientales. Algunos ejemplos de ella serían la liberación de hormonas por parte de células endocrinas, la liberación de neurotransmisor por parte de las neuronas y la liberación de enzimas digestivas por parte de las células acinares pancreáticas que se abordó al comienzo de este capítulo (véase Fig. 10.2). Las proteínas se distribuyen a la vía secretora regulada en la red *trans* del Golgi en la que son empaquetadas en vesículas secretoras especializadas. Aparentemente, en esta distribución intervienen los receptores de transporte que reconocen regiones señal compartidas por las numerosas proteínas que migran a través de esta vía. Estos complejos receptor-proteína de transporte se agregan de forma selectiva en las cisternas *trans* del Golgi y, a menudo, se fusionan entre sí para crear vesículas secretoras maduras. Estas vesículas almacenarán proteínas hasta recibir señales específicas que induzcan su fusión con la membrana plasmática. Por ejemplo, las enzimas digestivas sintetizadas por las células acinares del páncreas se almacenan en vesículas secretoras maduras hasta que la presencia de alimentos en el estómago y el intestino delgado desencadene su secreción.

Una complicación adicional en el transporte de las proteínas a la membrana plasmática surge en muchas células epiteliales que se encuentran polarizadas en los tejidos. La membrana plasmática de dichas células se divide en dos regiones distintas, el **dominio apical** y el **dominio basolateral**, que contienen proteínas específicas relacionadas con sus funciones diferenciadas. Por ejemplo, la membrana apical de las células epiteliales del intestino mira hacia la luz del intestino y está especializada en la absorción eficaz de nutrientes; el resto de la célula está rodeada por la membrana basolateral (Fig. 10.32). Los diferentes dominios de la membrana plasmática se encuentran no sólo en las células epiteliales, sino también en otros tipos de células. Por tanto, las proteínas que salen de la red *trans* del Golgi se deben transportar de forma selectiva a dominios diferentes de la membrana plasmática, lo que se lleva a cabo mediante el embalaje selectivo de proteínas en vesículas de transporte dirigidas específicamente al dominio apical o basolateral de la membrana plasmática, lo que puede producirse tanto en la red *trans* del Golgi como en endosomas de reciclaje.

La vía de distribución de proteínas mejor caracterizada en el Golgi es el transporte selectivo hacia los lisosomas (véase Fig. 10.31). Como ya se ha visto, las proteínas cuyo destino es el interior de los lisosomas están marca-

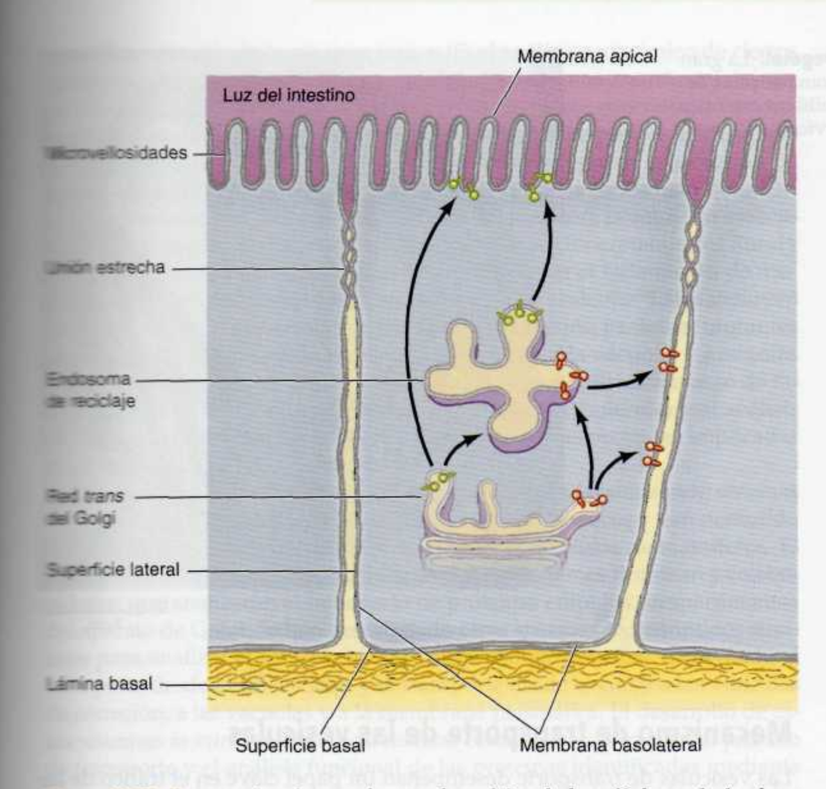


Figura 10.32 **Transporte a la membrana plasmática de las células polarizadas.** La membrana plasmática de las células epiteliales polarizadas se divide en los dominios apical y basolateral. En este ejemplo (epitelio intestinal), la superficie apical de la célula mira hacia la luz del intestino, las superficies laterales están en contacto con las células adyacentes y la superficie basal se apoya en una capa de matriz extracelular (la lámina basal). La membrana apical se caracteriza por la presencia de microvellosidades, que facilitan la absorción de los nutrientes al aumentar la superficie. Las proteínas específicas son dirigidas a la membrana apical o a la membrana basolateral en la red *trans* del Golgi. Las uniones estrechas entre las células adyacentes mantienen la identidad de las membranas apical y basolateral, al impedir la difusión de las proteínas entre estos dominios.

das con manosa-6-fosfato, que se origina por la modificación de sus *N*-oligosacáridos al poco tiempo de entrar en el aparato de Golgi. Un receptor específico en la membrana de la red *trans* del Golgi reconoce estos residuos de manosa-6-fosfato. Los complejos constituidos por el receptor más la enzima lisosómica se empaquetan en vesículas de transporte destinadas a los endosomas tardíos que posteriormente se convertirán en lisosomas maduros. Las proteínas cuyo destino es la membrana de los lisosomas están señalizadas por secuencias en sus colas citoplásmicas, en vez de por residuos de manosa-6-fosfato.

En las levaduras y en las células vegetales, que carecen de lisosomas, las proteínas son transportadas desde el aparato de Golgi hacia un destino adicional: **la vacuola** (Fig. 10.33). En estas células, las vacuolas asumen la función de los lisosomas además de realizar otros cometidos, como el almacenamiento de nutrientes y el mantenimiento de la presión de turgencia y del equilibrio osmótico. A diferencia de las proteínas destinadas a los lisosomas, las proteínas se destinan a las vacuolas mediante secuencias peptídicas cortas en lugar de a través de señales de carbohidratos.

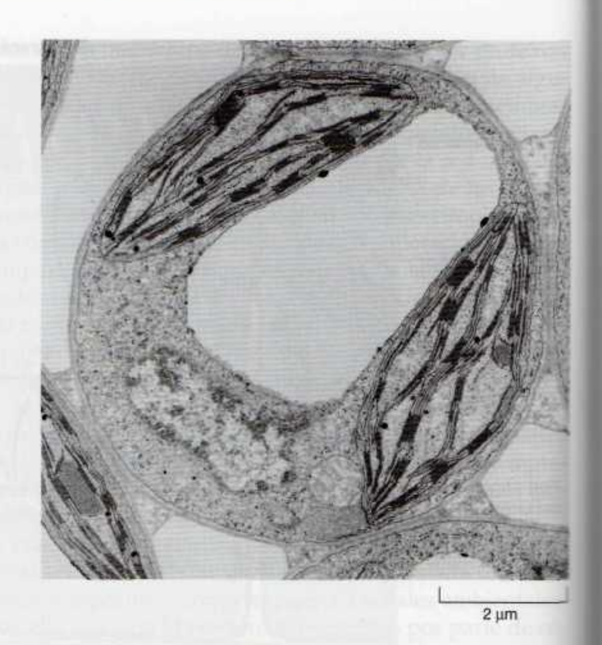


Figura 10.33 Vacuola de una célula vegetal. La gran vacuola central funciona como un lisosoma además de almacenar nutrientes y mantener el equilibrio osmótico. (E. H. Newcombe/Biological Photo Service.)

Mecanismo de transporte de las vesículas

Las vesículas de transporte desempeñan un papel clave en el tráfico de las moléculas entre los diferentes compartimentos rodeados de membrana que integran la vía secretora. Como se comentará en una sección posterior de este capítulo y en el Capítulo 13, las vesículas desempeñan una función similar en el transporte de material captado en la superficie celular. El transporte de las vesículas es, por tanto, una actividad celular fundamental, responsable del tráfico molecular entre diversos compartimentos rodeados por membrana, específicos. Por tanto, la selectividad de dicho transporte resulta clave para mantener la organización funcional de la célula. Por ejemplo, las enzimas lisosómicas deben transportarse específicamente desde el aparato de Golgi a los lisosomas —no a la membrana plasmática o al RE—. Algunas de las señales que dirigen las proteínas a los orgánulos específicos, como los lisosomas, ya se han tratado en este capítulo. Estas proteínas se transportan en vesículas, por lo que la especificidad del transporte se basa en el empaquetamiento selectivo de la carga seleccionada en vesículas que reconozcan y se fusionen sólo con la membrana diana apropiada. Dada la gran importancia que tiene el transporte de las vesículas en la organización de la célula eucariota, el conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan el empaquetamiento de las vesículas, la gemación, la distribución y la fusión es un área principal de investigación en biología celular.

Aproximaciones experimentales al conocimiento del transporte de las vesículas

Tres abordajes experimentales diferentes han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos del transporte de las vesículas: (1) el aislamiento de mutantes de levaduras defectuosas en el transporte y distribución de las proteínas; (2) la reconstitución del transporte de vesículas en sistemas acelulares; (3) el análisis bioquímico de las vesículas sinápticas, que son las responsables de la secreción regulada de los neurotransmisores por las neuronas; (4) la identificación de la vía de proteínas de fusión marcadas con GFP

específicas a través de la vía secretora, y (5) el análisis proteómico de ciertos compartimentos secretorios. Cada uno de estos sistemas experimentales tiene diferentes ventajas para el conocimiento de aspectos concretos del proceso de transporte y su utilización experimental ha hecho posible la identificación de mecanismos moleculares semejantes que regulan la secreción en células tan distintas como las levaduras y las neuronas de los mamíferos.

Las levaduras son útiles para estudiar la vía secretora porque son susceptibles de poderse realizar un análisis genético. Concretamente, Randy Schekman y sus colaboradores han sido pioneros en el aislamiento de mutantes de levaduras defectuosos en el transporte vesicular. Estos incluyen mutantes defectuosos en varios pasos de la secreción proteica (mutantes sec), mutantes incapaces de transportar proteínas a la vacuola, y mutantes incapaces de retener las proteínas residentes en el RE. El aislamiento de tales mutantes en las levaduras condujo a la clonación molecular y al análisis de los genes correspondientes, identificándose varias proteínas implicadas en diversos pasos de la vía secretora.

Los estudios bioquímicos sobre el transporte vesicular utilizando sistemas reconstituidos han complementado estos estudios genéticos y han permitido aislar directamente proteínas de transporte en las células de mamíferos. El primer sistema de transporte acelular lo desarrolló James Rothman y colaboradores, que analizaron el transporte de proteínas entre los compartimentos del aparato de Golgi. Se han desarrollado otros sistemas reconstituidos similares para analizar el transporte entre otros compartimentos, incluyendo el transporte desde el RE al Golgi y el transporte desde el Golgi a las vesículas de secreción, a las vacuolas y a la membrana plasmática. El desarrollo de estos sistemas *in vitro* ha permitido realizar estudios bioquímicos del proceso de transporte y el análisis funcional de las proteínas identificadas mediante mutaciones en levaduras, así como el aislamiento directo de algunas de las proteínas implicadas en la gemación y la fusión de las vesículas.

Los estudios sobre la transmisión sináptica en las neuronas, que representa una forma altamente especializada de la secreción regulada, han revelado aspectos críticos de los mecanismos moleculares del transporte vesicular. Una sinapsis es la unión de una neurona con otra célula, que puede ser o bien otra neurona o un efector, como una célula muscular. La información se transmite a través de la sinapsis mediante neurotransmisores químicos, como la acetilcolina, que se almacenan en **vesículas sinápticas**. La estimulación de la neurona transmisora desencadena la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, lo que produce la liberación de los neurotransmisores y la estimulación de la neurona postsináptica o célula efectora. Las vesículas sinápticas son extremadamente abundantes en el cerebro, lo que permite que se puedan purificar en grandes cantidades para el análisis bioquímico. Algunas de las proteínas aisladas de las vesículas sinápticas están estrechamente relacionadas con las proteínas que, mediante análisis genético de levaduras y experimentos de reconstitución, se mostró que desempeñan un papel crítico en el transporte de las vesículas, por lo que el análisis bioquímico de estas proteínas ha revelado aspectos importantes del mecanismo molecular de la fusión de las vesículas.

Estudios recientes que empleaban proteínas de fusión con GFP han permitido visualizar vesículas de transporte que portan proteínas específicas para su visualización mediante inmunofluorescencia a medida que se mueven a través de la vía secretora. En estos experimentos, las células eran transfectadas con construcciones de ADNc que codificaban para proteínas secretoras marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP) (véase Fig. 1.27). El progreso de las proteínas marcadas con GFP a través de la vía secretora puede seguirse en células vivas, permitiendo la caracterización de diversos aspectos de la dinámica e interacciones moleculares implicadas en el transporte vesicular.

Por último, en algunos trabajos recientes se han utilizado análisis proteómicos a gran escala de las proteínas presentes en ciertos compartimentos de la vía secretora. Por ejemplo, el aislamiento de compartimentos como el RE transicional o la red *trans* del Golgi y el análisis de su contenido proteico total mediante espectrometría de masas (véase Fig. 2.31) ha permitido identificar muchas proteínas desconocidas que intervienen en la selección y el empaquetamiento de la mercancía.

Selección de la mercancía, proteínas de la cubierta y gemación vesicular

Las vesículas de transporte que llevan proteínas secretoras desde el RE a otros compartimentos posteriores están recubiertas con proteínas de la cubierta citosólica, y por tanto se denominan vesículas cubiertas. Inicialmente, las proteínas secretoras se separan de las proteínas dirigidas a otros destinos y de las proteínas que deben permanecer en el RE (véase Fig. 10.24). Las cubiertas se ensamblan a medida que las vesículas que contienen las proteínas secretoras se separan de la membrana donante, y generalmente se eliminan de la vesícula citosólica antes de que alcance su diana (Fig. 10.34). Algunas de las proteínas restantes permiten a las vesículas viajar sobre los microtúbulos hasta sus dianas, mediante la interacción con motores moleculares específicos basados en tubulina como se describe en el Capítulo 12. En su membrana diana, las vesículas se detienen y fusionan con la membrana, liberando su mercancía luminal e insertando sus proteínas de membrana en la membrana diana.

La formación de vesículas cubiertas está regulada por proteínas pequeñas de unión a GTP relacionadas con Ras y Ran. Dos familias de proteínas de unión a GTP juegan papeles en la gemación de vesículas de transporte: factores de ADP-ribosilación (ARFs 1-3 y Sar1) y una gran familia de proteínas Rab. Éstas regulan a las proteínas adaptadoras que interaccionan directamente con una proteína de la cubierta vesicular. La unión de proteínas de unión a GTP y proteínas adaptadoras establece una «plataforma» sobre

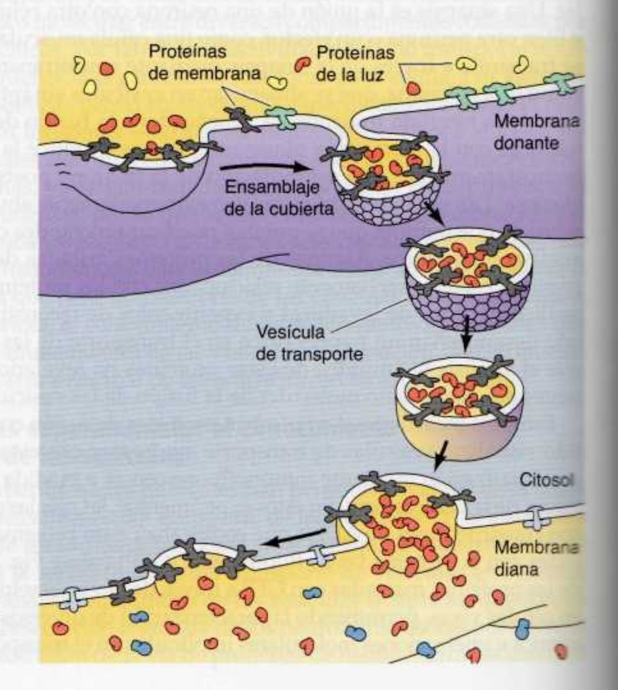


Figura 10.34 Formación y fusión de una vesícula de transporte. Las proteínas de membrana y las proteínas secretoras de la luz y sus receptores se recogen en ciertas regiones de una membrana donante en las que la formación de una cubierta citosólica dará lugar a la formación de una vesícula de transporte por gemación. Durante el transporte la cubierta se desensambla, y la vesícula de transporte llega y se fusiona con la membrana diana.

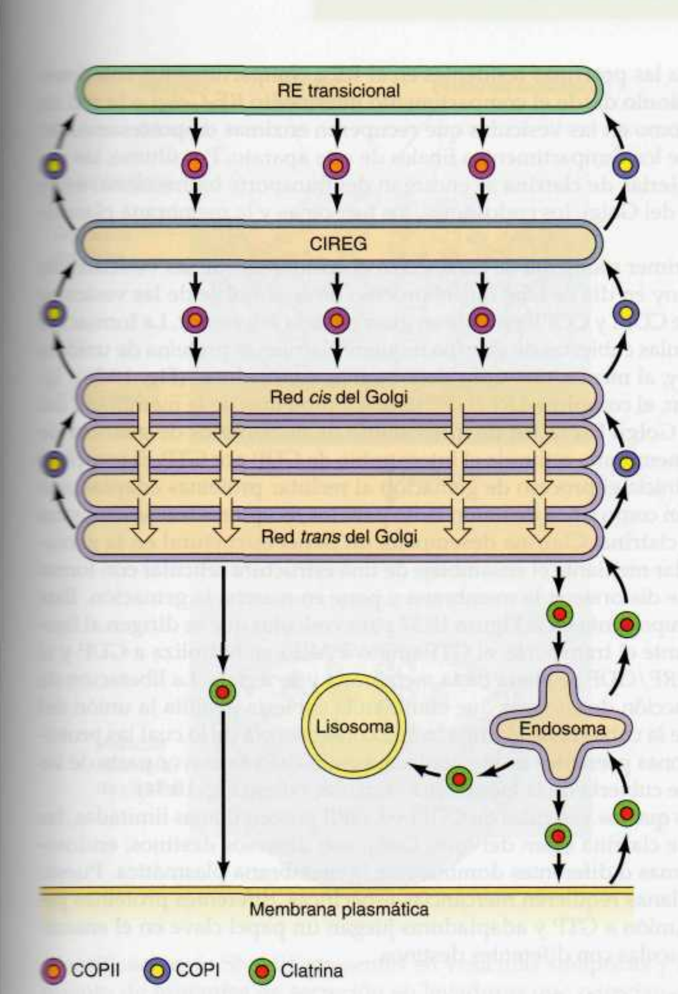


Figura 10.35 Transporte a través de vesículas cubiertas. Las vesículas cubiertas de COPII transportan su mercancía del RE al aparato de Golgi y las vesículas cubiertas de clatrina lo hacen en sentido retrógrado desde la red *trans* del Golgi. Las moléculas secretoras migran a través de las cisternas en maduración del Golgi. Las vesículas cubiertas de clatrina también llevan a cabo un transporte retrógrado desde la membrana plasmática hacia los endosomas y otros orgánulos, como la red *trans* del Golgi y los lisosomas. Las vesículas cubiertas de COPI recuperan proteínas residentes del CIREG y la red *cis* del Golgi y transportan a enzimas residentes en el aparato de Golgi desde la red *trans* hacia las cisternas.

la membrana para procesos específicos, como el reclutamiento de ciertas proteínas transmembrana y complejos proteína-receptor de transporte, además del ensamblaje y la gemación de las vesículas de trasporte. Las proteínas individuales que integran el complejo (proteínas de la cubierta, proteínas adaptadoras y proteínas de unión a GTP) pueden intervenir en el ensamblaje de vesículas de transporte dirigidas a otros destinos o bien en la fusión de vesículas (que se tratará en otra sección de este capítulo), aunque cada complejo proteico es exclusivo de una vía particular de gemación, transporte o fusión.

Se conocen tres familias de proteínas de cubierta de las vesículas: **clatrina, COPI** y **COPII** (COP indica proteína de la cubierta). Las vesículas recubiertas con estas proteínas intervienen en el transporte entre distintos compartimentos de la vía secretora (Fig. 10.35). Las **vesículas cubiertas de COPII** se encargan de transportar proteínas secretoras desde el RE al compartimento intermedio RE-Golgi y el aparato de Golgi, de modo que salen por gemación del RE transicional y transportan su mercancía hacia etapas posteriores de la vía secretora. Por el contrario, las **vesículas cubiertas de COPI** abandonan el compartimento intermedio RE-Golgi por gemación y llevan su carga en sentido retrógrado para devolver a las proteínas residentes a los compartimentos anteriores de dicha vía. Por consiguiente, COPI es una proteína de cubierta presente tanto en las vesículas de recuperación que

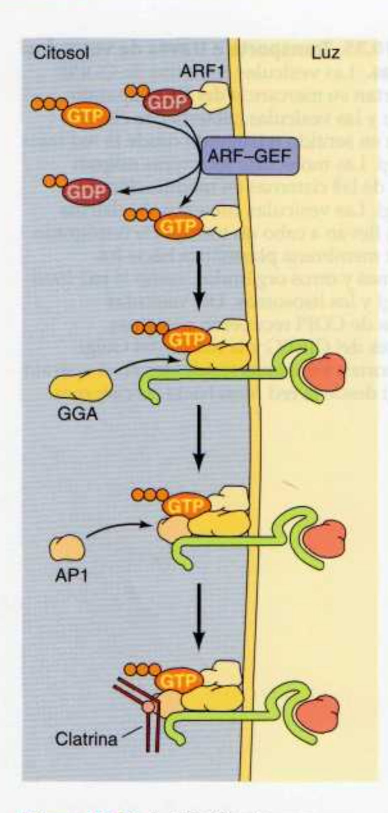


Figura 10.36 Iniciación de una vesícula revestida de clatrina por ARF1. La proteína pequeña de unión a GTP, ARF1, puede iniciar la formación de una vesícula revestida de clatrina en la membrana del *trans* Golgi. Una vez transportada a la membrana, ARF/GDP es activada en ARF/GTP por un factor de intercambio de nucleótidos de guanina específica para ARF (ARF-GEF). ARF/GTP recluta una proteína adaptadora GGA a la membrana y esta proteína recluta un receptor transmembrana que mantiene unida su mercancía de la luz, mediante la interacción con la cola citoplásmica del receptor. A continuación GGA recluta una segunda proteína adaptadora, AP1 que sirve como sitio de unión para el ensamblaje de la cubierta de clatrina.

devuelven a las proteínas residentes en el RE a compartimentos anteriores de este orgánulo desde el compartimento intermedio RE-Golgi o la red *cis* del Golgi como en las vesículas que recuperan enzimas de procesamiento del Golgi de los compartimentos finales de este aparato. Por último, las **vesículas cubiertas de clatrina** se encargan del transporte bidireccional entre la red *trans* del Golgi, los endosomas, los lisosomas y la membrana plasmática.

En un primer momento se caracterizó el ensamblaje de las vesículas de clatrina y hoy en día se sabe que el proceso de ensamblaje de las vesículas cubiertas de COPI y COPII remeda en gran medida al anterior. La formación de las vesículas cubiertas de clatrina requiere clatrina, la proteína de unión a GTP ARF1 y, al menos, dos tipos de proteínas adaptadoras (Fig. 10.36). En primer lugar, el complejo ARF/GTP se une a proteínas de la membrana del aparato de Golgi. Un factor de intercambio de nucleótidos de guanina de ARF de la membrana estimula el intercambio de GDP por GTP. El complejo ARF/GTP inicia el proceso de gemación al reclutar proteínas adaptadoras que actuarán como sitios de unión tanto para los receptores transmembrana como para clatrina. Clatrina desempeña un papel estructural en la gemación vesicular mediante el ensamblaje de una estructura reticular con forma de cesto que distorsiona la membrana y pone en marcha la gemación. Este proceso se representa en la Figura 10.37 para vesículas que se dirigen al lisosoma. Durante el transporte, el GTP unido a ARF1 se hidroliza a GDP y el complejo ARF/GDP se libera de la membrana y se recicla. La liberación de ARF1 y la acción de enzimas que eliminan la cubierta debilita la unión del complejo de la cubierta de clatrina, como consecuencia de lo cual las proteínas chaperonas presentes en el citoplasma escindirán la mayor parte de las proteínas de cubierta de la membrana vesicular (véase Fig. 10.34).

Mientras que las vesículas de COPI y COPII poseen dianas limitadas, las vesículas de clatrina salen del *trans* Golgi con diversos destinos: endosomas, lisosomas o diferentes dominios de la membrana plasmática. Puesto que estas dianas requieren mercancías específicas, diferentes proteínas pequeñas de unión a GTP y adaptadoras juegan un papel clave en el ensamblaje de vesículas con diferentes destinos.

Fusión de las vesículas

La fusión de una vesícula de transporte con su diana implica dos tipos de acontecimientos. En primer lugar, la vesícula de transporte debe reconocer específicamente la membrana diana correcta; por ejemplo, una vesícula que transporta enzimas lisosómicas tiene que llevar su carga sólo a los lisosomas. En segundo lugar, la membrana de la vesícula y la membrana diana deben fusionarse, entregándose el contenido de la vesícula al orgánulo diana. Las investigaciones realizadas en los últimos años han conducido a un modelo de fusión vesicular en el que el reconocimiento específico entre una vesícula y su diana está mediado por la interacción específica entre pares de proteínas transmembrana, seguido de la fusión entre las bicapas fosfolipídicas de la vesícula y de la membrana diana.

Las proteínas implicadas en la fusión de las vesículas se identificaron por primera vez en el laboratorio de James Rothman, mediante el análisis bioquímico de sistemas de transporte vesicular reconstituidos procedentes de células de mamíferos. El análisis de las proteínas implicadas en la fusión de las vesículas en estos sistemas condujo a Rothman y a sus colaboradores a proponer que la fusión de vesículas estaría mediada por la interacción de pares específicos de proteínas transmembrana, denominadas SNARE, en la membrana vesicular y la membrana diana (v-SNARE y t-SNARE, respectivamente). La formación de complejos entre v-SNARE y t-SNARE daría lugar a la fusión de las membranas. Esta hipótesis se vio respaldada por la

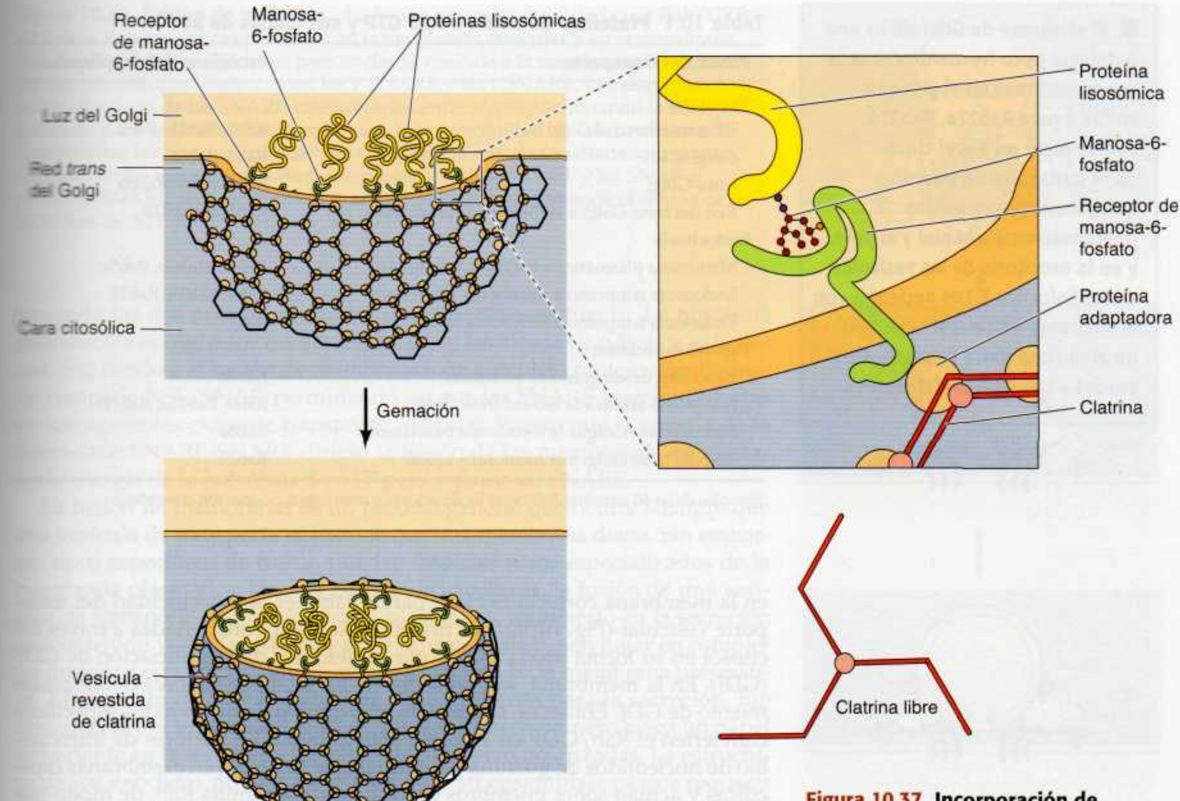


Figura 10.37 Incorporación de proteínas lisosómicas a vesículas revestidas por clatrina. Las proteínas dirigidas a los lisosomas están marcadas por manosa-6-fosfato, que se une a los receptores de manosa-6-fosfato en la red *trans* del Golgi. Los receptores de manosa-6-fosfato atraviesan la membrana del Golgi y actúan como sitios de unión para las proteínas adaptadoras citosólicas, que a su vez se unen a la clatrina. Las clatrinas están constituidas por tres cadenas proteicas que se asocian entre sí para formar una red semejante a la de las canastas de baloncesto, que distorsiona la membrana y dirige la gemación de las vesículas.

identificación de SNARE presentes en vesículas sinápticas y el descubrimiento de mutantes de secreción en levaduras que parecían codificar las SNARE necesarias para diversos sucesos del transporte vesicular. Por ejemplo, el transporte desde el RE hasta el Golgi en levaduras requiere SNARE específicas que están localizadas tanto en la membrana vesicular como en la membrana diana.

Algunos estudios posteriores han confirmado que las SNARE son necesarias para la fusión de una vesícula con una membrana diana y que el apareamiento SNARE-SNARE proporciona la energía necesaria para acercar ambas bicapas lo suficiente como para desestabilizarlas y fusionarlas. Sin embargo, la llegada, unión y fusión de las vesículas de transporte a membranas diana específicas también está mediada por complejos proteicos de ensamblaje secuencial muy parecido al que da lugar a la gemación de las vesículas de transporte. La **Rab** de proteínas pertenecientes a las proteínas pequeñas de unión a GTP, desempeña papeles clave en la llegada de las vesículas de transporte. Las proteínas Rab, al igual que la familia ARF, participan en muchas de las reacciones de gemación y fusión de vesículas durante el transporte vesicular. Más de 60 proteínas Rab diferentes han sido identificadas e implicadas en procesos específicos del transporte vesicular (Tabla 10.1). Funcionan en muchos pasos del tráfico vesicular, incluyendo la interacción con las SNARE para regular y facilitar la formación de los complejos SNARE/SNARE.

Las proteínas Rab individuales o combinaciones de proteínas Rab caracterizan a distintos orgánulos y vesículas de transporte, así que su localización

■ El síndrome de Griscelli es una patología poco frecuente causada por mutaciones en el gen que codifica para Rab27a. Rab27a parece jugar un papel clave en el transporte de vesículas que contienen pigmentos (melanosomas) a la piel y el pelo, y en la exocitosis de las vesículas de los linfocitos T. Los pacientes con el síndrome de Griscelli exhiben un albinismo (falta de pigmentos) parcial y son inmunodeficientes.

Tabla 10.1 Proteínas de unión a Rab GTP y sus dianas de acción

Pasos del transporte	Proteínas Rab implicadas
Exocitosis	
RE transicional al Golgi	Rab1, Rab1b, Rab2
Golgi al RE	Rab6, Rab6b
Intra-Golgi	Rab1, Rab6, Rab6b
Red del *trans* Golgi a la membrana plasmática	Rab11a, Rab11b
Endocitosis	
Membrana plasmática a endosoma temprano	Rab5a, Rab5b, Rab5c
Endosoma temprano a membrana plasmática	Rab4, Rab15, Rab18
Endosoma temprano a endosoma tardío	Rab7
Papeles especiales	
Exocitosis desde gránulos secretores	Rab8b
Endosoma tardío a la red del *trans* Golgi	Rab9, Rab11a, Rab11b
Red del *trans* Golgi a la membrana basolateral	Rab8a
Red del *trans* Golgi a la membrana apical	Rab21

Ejemplos de las 60 proteínas Rab cuyas localizaciones y presuntas funciones son conocidas.

en la membrana correcta es clave para establecer la especificidad del transporte vesicular (Fig. 10.38). Las proteínas Rab son transportadas a través del citosol en su forma unida a GDP por inhibidores de la disociación de GDP (GDI). En la membrana, son retirados de los GDI por factores de desplazamiento de GDI. Entonces, factores de intercambio de nucleótidos específicos convierten el Rab/GDP en la forma activa Rab/GTP. Factores de intercambio de nucleótidos de guanina individuales se localizan en membranas específicas y actúan sobre miembros específicos de la familia Rab, de modo que son responsables de la formación de los complejos Rab/GTP activos en los puntos correctos de la membrana. Así, la activación completa de una proteína Rab requiere que se una a GTP y estar asociado con una membrana.

Para iniciar la fusión de las vesículas de transporte, el Rab/GTP de la vesícula de transporte recluta proteínas efectoras y v-SNARE para ensamblar un complejo de pre-fusión (Fig. 10.39). Una proteína Rab distinta en la membrana diana organiza, de forma similar, otras proteínas efectoras y t-SNARE. Cuando la vesícula de transporte se encuentra con su membrana diana, las proteínas efectoras unen las membranas mediante interacciones proteína-proteína. Este anclaje de la vesícula a la membrana diana estimula la hidrólisis de Rab/GTP y permite que las v-SNARE contacten con las t-SNARE. Todas las proteínas SNARE poseen un largo dominio central de hélice enrollada como la que se encuentra en las láminas nucleares (véase Fig. 9.4). Al igual que en las láminas, este dominio se une fuertemente a otros dominios de hélice enrollada y, en efecto, une a las SNARE, apro-

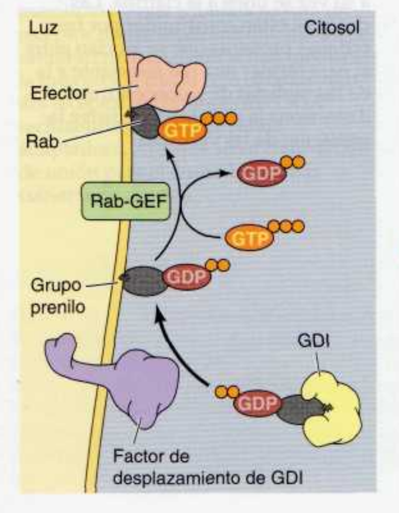


Figura 10.38 Transporte de Rab a una membrana. La proteína pequeña de unión a GTP Rab se modifica por la adición de un grupo prenilo, que le permite insertarse en una membrana (véase Fig. 8.34). Rab es transportada en el citosol unida a un inhibidor de disociación de GDP (GDI), que la mantiene en el estado Rab/GDP. En la membrana, un factor de desplazamiento de GDI inespecífico puede separar el Rab/GDP del GDI e insertarlo en la membrana. Si se encuentra presente un factor de intercambio de nucleótidos de guanina específico para Rab, el GDP unido a Rab será intercambiado por GTP, y la forma activa Rab/GTP puede interaccionar con proteínas efectoras. Si el factor de intercambio de nucleótidos de guanina apropiado no está presente, el Rab/GDP será retirado por una GDI y transportado a otra membrana.

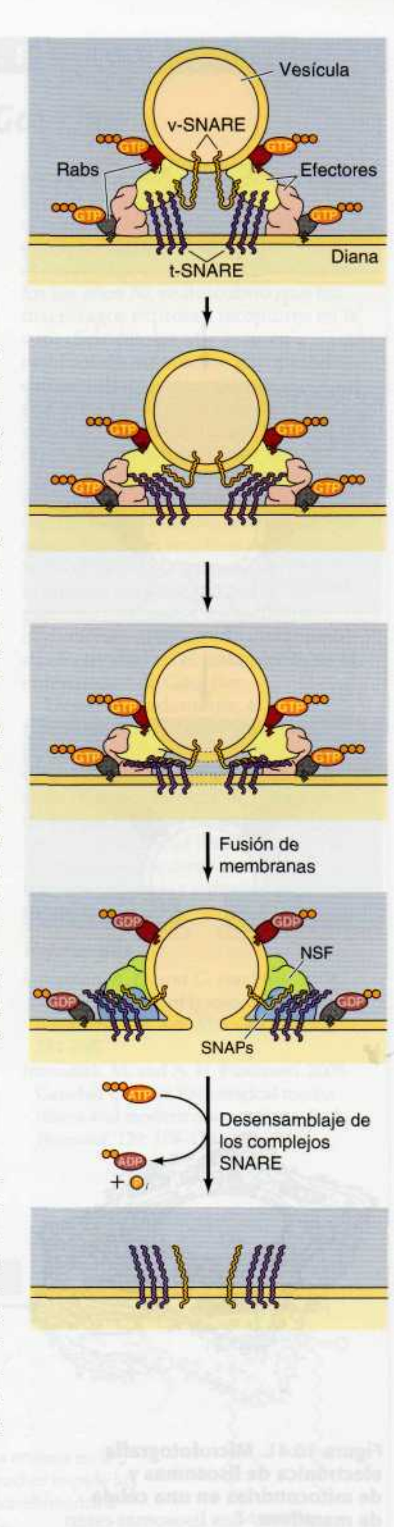


Figura 10.39 Fusión de vesículas. La fusión vesicular es iniciada por Rab/GTP. Proteínas Rab específicas presentes en la membrana vesicular y en la membrana diana unen proteínas efectoras para anclar la vesícula a la membrana diana. Este anclaje permite que interaccionen las v-SNARE y las t-SNARE. Los dominios de hélice enrollada de las SNARE interaccionan entre sí, proporcionando la energía necesaria para aproximar las membranas. Esta proximidad de las membranas desestabiliza las bicapas lipídicas y la vesícula y la membrana diana se fusionan. Cambios en las interacciones proteína-proteína reclutan a NSF y las SNAP al complejo SNARE, y desensamblan el complejo empleando energía obtenida de la hidrólisis de ATP.

aproximando las dos membranas hasta un contacto casi directo. La hipótesis más sencilla es que esto crea inestabilidad en las bicapas lipídicas y se fusionan. Siguiendo a la fusión de membranas, un complejo proteico denominado complejo NSF/SNAP, permitiendo así que las SNARE sean reutilizadas en los siguientes ciclos de transporte vesicular. Puesto que la energía de la interacción SNARE-SNARE dirigió la fusión de las membranas, es necesaria la energía de la hidrólisis de ATP para separar las SNARE.

La fusión de membranas es un proceso general que ocurre siempre que una vesícula de transporte se fusione con una membrana diana. Sin embargo, tipos específicos de fusión pueden implicar sitios especializados de la membrana plasmática. Uno de éstos, es la exocitosis, la fusión de una vesícula de transporte con la membrana plasmática, resultando en la secreción del contenido vesicular. Muchos tipos de exocitosis tienen lugar en complejos proteicos específicos, denominados **exocistos**, en la membrana plasmática. El requisito de este complejo de ocho proteínas para la secreción, fue descubierto por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae*, pero juega un papel importante en la secreción de células de mamífero polarizadas. La estructura de los exocistos no se conoce bien pero su ensamblaje parece requerir interacciones secuenciales entre las ocho proteínas del exocisto localizadas tanto en la vesícula de transporte como en la membrana diana (Fig. 10.40). La interacción de estas proteínas resulta en el envío eficiente de la vesícula de transporte a una localización específica en la membrana plasmática. Diversas proteínas de unión a GTP de bajo peso molecular también están asociadas con los exocistos; algunas, como las proteínas Rab, están implicadas en la llegada de la vesícula y su fusión, pero otras pueden jugar un papel en la localización de los exocistos en las membranas apicales o basolaterales o en los axones o dendritas.

Lisosomas

Los **lisosomas** son orgánulos rodeados de membrana que contienen una serie de enzimas capaces de degradar todas las clases de polímeros biológicos —proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos—. Los lisosomas funcionan como el sistema digestivo de la célula, sirviendo tanto para degradar el material captado del exterior de la célula como para digerir los componentes obsoletos de la propia célula. En su forma más sencilla, los lisosomas se observan como vacuolas esféricas densas, pero pueden exhibir diversidad de tamaños y de formas en función de los distintos materiales que hayan captado (Fig. 10.41). Por tanto, los lisosomas representan orgánulos morfológicamente diversos definidos por la función común de degradar material intracelular.

Hidrolasas lisosómicas ácidas

Los lisosomas contienen alrededor de 50 enzimas degradativas diferentes que pueden hidrolizar proteínas, ADN, ARN, polisacáridos y lípidos. Las

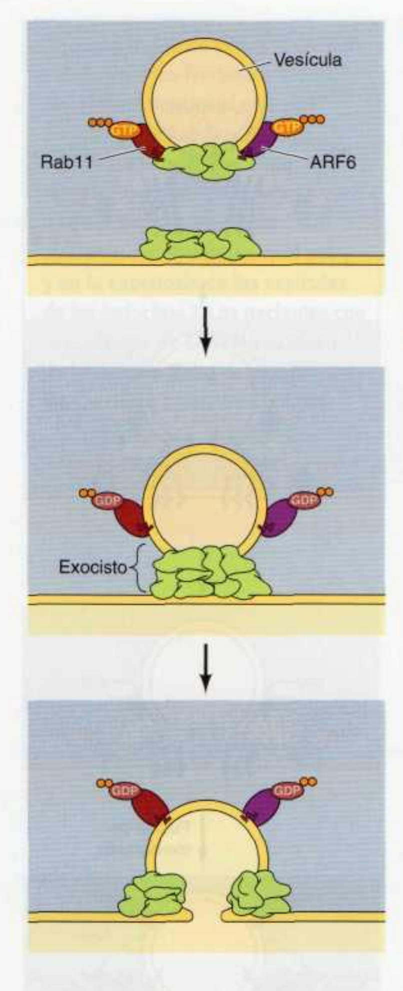


Figura 10.40 Ensamblaje del exocisto y envío de la vesícula a su diana. Los exocistos son complejos de ocho proteínas diferentes formados durante la exocitosis a partir de proteínas presentes tanto en las vesículas de transporte como en regiones específicas de la membrana plasmática. La unión de los exocistos resulta en la fusión vesicular mediada por SNARE normal. Proteínas de unión a GTP de bajo peso molecular, incluidas Rab11 y ARF6, regulan el ensamblaje del complejo del exocisto en la vesícula de transporte y coordinan su movimiento hacia el sitio diana.

mutaciones en los genes que codifican estas proteínas son responsables de más de 30 enfermedades congénitas humanas diferentes, que se denominan **enfermedades de depósito lisosómico**, ya que el material no degradado se acumula en los lisosomas de los individuos afectados. La mayoría de estas enfermedades se deben a deficiencias en una única enzima lisosómica. Por ejemplo, la enfermedad de Gaucher (la alteración más común) se debe a una mutación en el gen que codifica una enzima lisosómica requerida para la degradación de los glicolípidos. Una excepción curiosa es la enfermedad celular-I, que se debe a una eficiencia en la enzima que cataliza el primer paso en el marcaje de las enzimas lisosómicas con manosa-6-fosfato en el aparato de Golgi (véase Fig. 10.29). El resultado es una alteración generalizada en la incorporación de las enzimas lisosómicas a los lisosomas.

La mayoría de las enzimas lisosómicas son hidrolasas ácidas, que son activas al pH ácido (aproximadamente 5) del interior de los lisosomas pero no al pH neutro (aproximadamente 7,2) característico del resto del citoplasma (Fig. 10.42). El que estas hidrolasas lisosómicas necesiten un pH ácido proporciona una doble protección contra la digestión incontrolada de los contenidos del citosol; incluso si se rompiera la membrana lisosómica, las hidrolasas ácidas liberadas serían inactivas al pH neutro del citosol. Para mantener su pH ácido interno, los lisosomas deben concentrar activamente iones H^+ (protones). Esto se consigue mediante una bomba de protones en la membrana lisosómica, que transporta activamente protones al lisosoma desde el citosol. Este bombeo requiere un gasto de energía en forma de hidrólisis de ATP, ya que mantiene una concentración de H^+ aproximadamente cien veces más elevada en el interior del lisosoma que en el citoplasma.



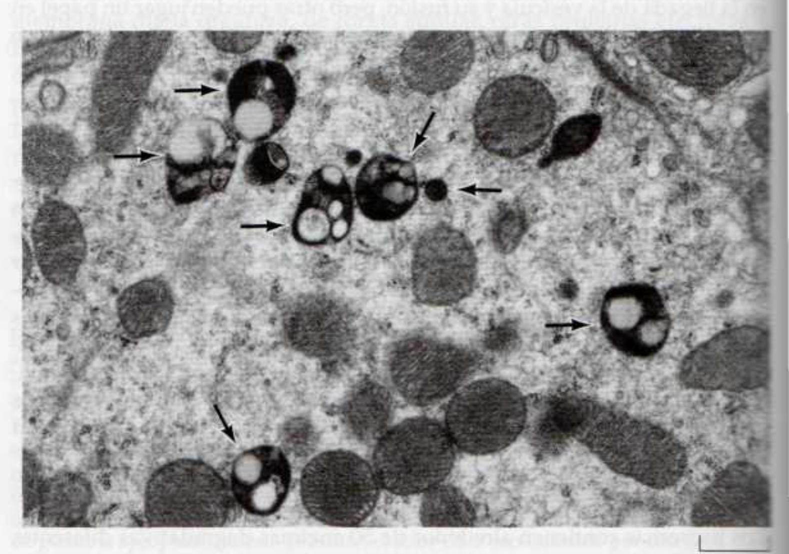


Figura 10.41 Microfotografía electrónica de lisosomas y de mitocondrias en una célula de mamífero. Los lisosomas están indicados con flechas. (K. G. Murti / Visuals Unlimited.)



MEDICINA MOLECULAR

Enfermedad de Gaucher

Enfermedad

La enfermedad de Gaucher es, de las enfermedades de depósito lisosómico, la más común, las cuales se deben a la incapacidad de los lisosomas para degradar sustancias que deberían degradar. La acumulación resultante de los compuestos no degradados da lugar a un aumento en el tamaño y número de los lisosomas en la célula, lo que acaba produciendo la disfunción celular y consecuencias patológicas en los órganos afectados. La enfermedad de Gaucher afecta principalmente a la población judía, con una frecuencia de aproximadamente 1 por cada 2.500 individuos. La enfermedad tiene tres variantes, que difieren en su severidad y en cómo afectan al sistema nervioso. La forma más común de la enfermedad (tipo I), no afecta al sistema nervioso; la enfermedad se manifiesta con esplenomegalia y hepatomegalia y por el desarrollo de lesiones óseas. Muchos pacientes con esta forma de la enfermedad no tienen síntomas importantes, y su esperanza de vida no se ve afectada. Las formas más severas de la enfermedad (tipos II y III) son mucho menos frecuentes y se presentan tanto en poblaciones judías como no judías. La forma más devastadora es la enfermedad tipo II, en la que la afectación neurológica es evidente en la infancia y los pacientes mueren a una edad temprana. La enfermedad tipo III, de severidad intermedia entre los tipos I y II, se caracteriza por la aparición de síntomas neurológicos (incluyendo demencia y espasticidad) alrededor de los diez años de edad.

Bases moleculares y celulares

La causa de la enfermedad de Gaucher es la deficiencia de la enzima lisosómica glucocerebrosidasa, que cataliza la hidrólisis de los glucocerebrósidos a glucosa y ceramida (véase la figura). Este déficit enzimático se demostró en 1965, y el gen responsable fue clonado en 1985. Desde entonces, se han identificado más de 30 mutaciones diferentes responsables de la enfermedad de Gaucher. Es interesante señalar que puede predecirse, en gran medida, la severidad de la enfermedad según la naturaleza de la mutación. Por ejemplo, los pacientes con una mutación que conduce a la sustitución, relativamente conservada, del aminoácido serina por asparragina tienen la enfermedad tipo I; los pacientes con una mutación que da lugar a la sustitución de prolina por leucina tienen deficiencias enzimáticas más severas y desarrollan la enfermedad tipos II o III.

Excepto en las formas muy raras de la enfermedad, tipos II y III, las únicas células afectadas en la enfermedad de Gaucher son los macrófagos. Debido a que su función es eliminar las células envejecidas y dañadas mediante fagocitosis, los macrófagos continuamente ingieren gran cantidad de lípidos, que normalmente son degradados en los lisosomas. Por tanto, las deficiencias de glucocerebrosidasa resultan particularmente evidentes en los macrófagos de estos órganos, lo que concuerda con que estos serían los principales órganos afectados en la mayor parte de los casos de enfermedad de Gaucher.

Prevención y tratamiento

La enfermedad de Gaucher es uno de los ejemplos más importantes de una enfermedad que puede tratarse mediante tratamiento enzimático sustitutivo, en el que se utiliza la administración exógena de una enzima para corregir un defecto enzimático. Este abordaje del tratamiento de las enfermedades de depósito lisosómico lo sugirió Christian de Duve en los años 60, y se basa en la idea de que las enzimas administradas exógenamente podrían ser ingeridas por endocitosis y transportarse a los lisosomas. Este abordaje es especialmente interesante en la enfermedad de Gaucher tipo I, ya que el macrófago es la única célula diana. En los años 70, se descubrió que los macrófagos expresan receptores en la superficie celular que se unen a residuos de manosa de glicoproteínas extracelulares e internalizan posteriormente estas proteínas por endocitosis. Este hallazgo hizo pensar que la glucocerebrosidasa administrada exógenamente podría ser dirigida específicamente a los macrófagos mediante modificaciones que expusieran residuos de manosa. Se modificó de la manera pertinente la enzima preparada a partir de placenta humana, y los estudios clínicos han demostrado claramente su efectividad en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

Desafortunadamente, el tratamiento sustitutivo enzimático para la enfermedad de Gaucher es caro. El coste de este tratamiento lo sitúa muy por encima de los recursos de los pacientes, y ha generado la controversia social respecto al coste de los fármacos caros para el tratamiento de las enfermedades poco frecuentes.

Referencias

Futerman, A. H. and G. van Meer. 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 554–565.

Jmoudiak, M. and A. H. Futerman. 2005. Gaucher disease: Pathological mechanisms and modern management. *Br. J. Haematol.* 129: 178–188.

Glucocerebrosidasa
Glucocerebrósido
Glucosa
Ceramida
O
CH_2
HC—NH
HCOH C=O
OH

La deficiencia de la enzima en la enfermedad de Gaucher impide la hidrólisis de glucocerebrósidos a glucosa y ceramida.

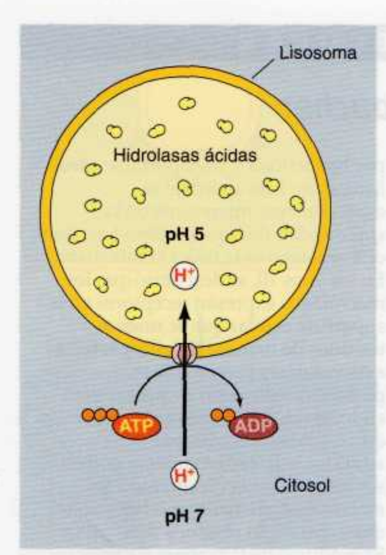


Figura 10.42 Organización del lisosoma. Los lisosomas contienen diversas hidrolasas ácidas que son activas al pH ácido interno del lisosoma, pero no al pH neutro del citosol. El pH interno ácido de los lisosomas es el resultado de la acción de una bomba de protones en la membrana del lisosoma, que importa protones desde el citosol acoplado a la hidrólisis de ATP.

■ **El medicamento antimalárico cloroquina carece de carga y es capaz de atravesar membranas a pH fisiológicos. A pH acídicos, la cloroquina posee carga positiva y se acumula en el interior de las vacuolas digestivas del parásito (análogas a los lisosomas). La concentración elevada de cloroquina en el interior de las vacuolas digestivas se cree que es responsable de su actividad frente al parásito.**

Endocitosis y formación del lisosoma

Una de las funciones principales de los lisosomas es la digestión del material captado del exterior de la célula mediante **endocitosis**, que se discute en detalle en el Capítulo 13. Sin embargo, el papel de los lisosomas se relaciona no sólo con su función, sino también con su formación. Concretamente, los lisosomas se forman mediante la fusión de las vesículas de transporte originadas desde la red *trans* del Golgi con un endosoma tardío, que contienen las moléculas ingeridas por endocitosis a partir de la membrana plasmática.

La formación de los **endosomas** y de los lisosomas representa así una intersección entre la vía secretora, mediante la que se procesan las proteínas lisosómicas, y la vía endocítica, mediante la cual son ingeridas las moléculas extracelulares a partir de la superficie de la célula (Fig. 10.43). El material del exterior de la célula es ingerido en vesículas endocíticas revestidas de clatrina, que se originan por gemación de la membrana plasmática y seguidamente se funden con los endosomas primarios. A continuación los componentes de la membrana son reciclados a la membrana plasmática (se tratará con detalle en el Cap. 13) y los endosomas primarios van madurando a endosomas tardíos, que son los precursores de los lisosomas. Uno de los cambios importantes durante la maduración del endosoma es el descenso del pH interno hasta aproximadamente 5,5, lo que desempeña un papel clave en la liberación de las hidrolasas ácidas lisosómicas desde la red *trans* del Golgi.

Como se trató previamente, las hidrolasas ácidas son dirigidas a los lisosomas por residuos de manosa-6-fosfato, que son reconocidos por los receptores de manosa-6-fosfato en la red *trans* del Golgi y empaquetados en vesículas revestidas de clatrina. Tras la liberación de la cubierta de clatrina, estas vesículas de transporte se fusionan con los endosomas tardíos, y el pH interno ácido hace que las hidrolasas se disocien del receptor de manosa-6-fosfato (véase Fig. 10.43). Las hidrolasas son así liberadas en la luz del endosoma, mientras que los receptores permanecen en la membrana y finalmente son reciclados al Golgi. Los endosomas tardíos, que contienen un complemento completo de hidrolasas ácidas, se fusionan con lisosomas o maduran para convertirse en lisosomas, que se ocupan de digerir las moléculas ingeridas por endocitosis.

Fagocitosis y autofagia

Además de degradar las moléculas englobadas por endocitosis, los lisosomas digieren el material derivado de otras dos rutas: la fagocitosis y la autofagia (Fig. 10.44). En la **fagocitosis**, células especializadas, como los macrófagos, ingieren y degradan partículas grandes, incluyendo bacterias, restos de células, y células envejecidas que han de ser eliminadas del organismo. Estas partículas grandes son ingeridas en vacuolas fagocíticas (**fagosomas**), que posteriormente se fusionan con los lisosomas, dando lugar a la digestión de su contenido. Los lisosomas formados de esta manera (**fagolisosomas**) pueden ser bastante grandes y heterogéneos, ya que su tamaño y

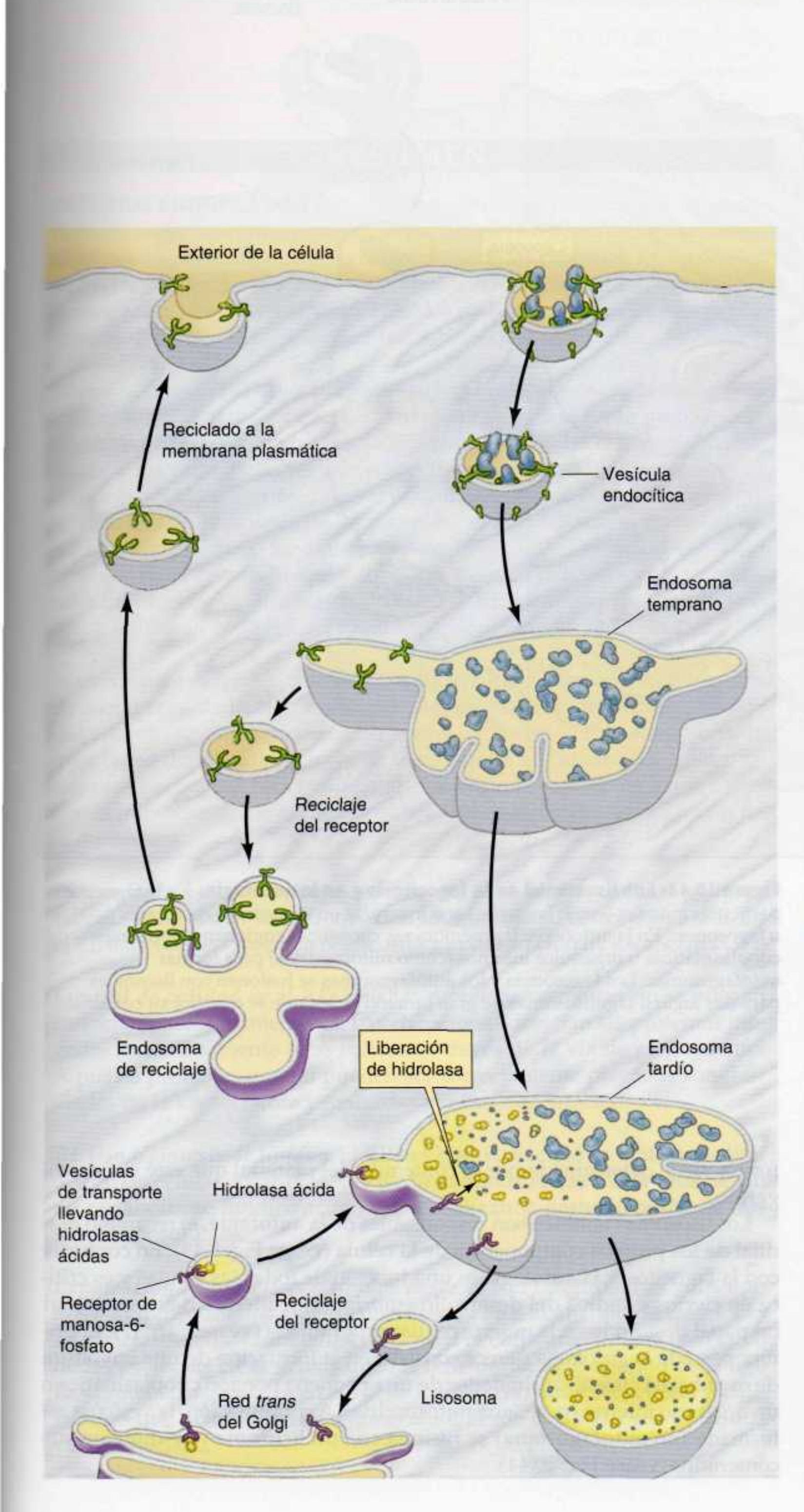


Figura 10.43 Endocitosis y formación de los lisosomas. Las moléculas son captadas del exterior de la célula mediante vesículas endocíticas que se fusionan con los endosomas tempranos. Los receptores de membrana se reciclan hacia la membrana plasmática por medio de endosomas de reciclaje. Los endosomas tempranos maduran para dar lugar a endosomas tardíos. Las vesículas de transporte que llevan las hidrolasas ácidas desde la red *trans* del Golgi se fusionan con los endosomas tardíos, que se transforman en lisosomas tras adquirir un complemento completo de enzimas lisosómicas. Las hidrolasas ácidas se disocian del receptor de manosa-6-fosfato cuando las vesículas de transporte se fusionan con los endosomas tardíos y estos receptores regresan de nuevo a la red *trans* del Golgi.

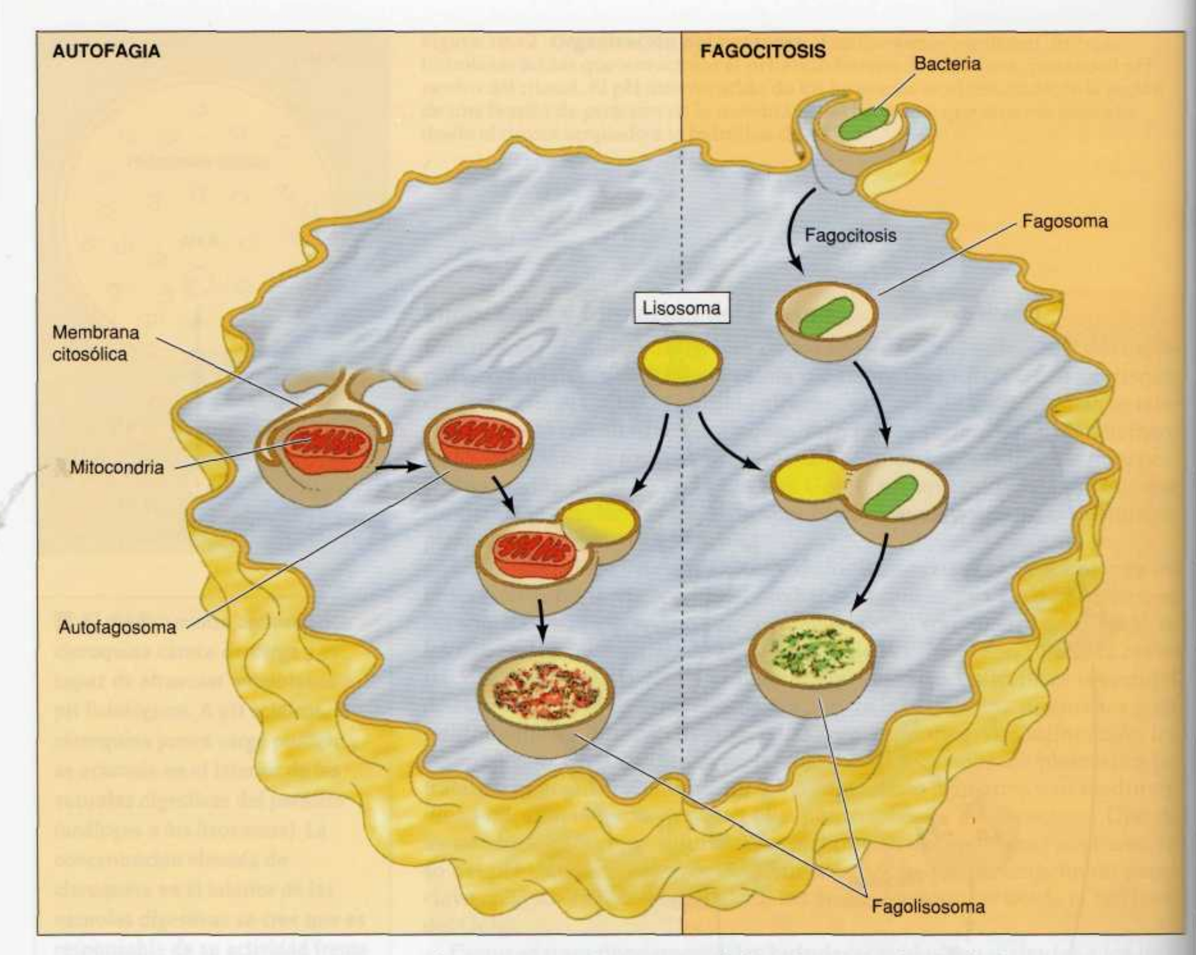


Figura 10.44 Los lisosomas en la fagocitosis y en la autofagia. En la fagocitosis, partículas grandes (como bacterias) son ingeridas en vacuolas fagocíticas o fagosomas. En la autofagia, las membranas citosólicas engloban a porciones citoplasmáticas u orgánulos internos (como mitocondrias) para formar autofagosomas. Los fagosomas y los autofagosomas se fusionan con lisosomas para dar lugar a fagolisosomas de gran tamaño en los que se digerirá su contenido.

forma viene determinado por el contenido del material que esté siendo digerido.

Los lisosomas también son responsables de la **autofagia**, el recambio gradual de los propios componentes de la célula (véase Fig. 8.45). En contraste con la fagocitosis, la autofagia es una función de todas las células y es crítica en ciertos estadios del desarrollo embrionario, además de desempeñar un papel destacado en la muerte celular programada (véase Cap. 17). El primer paso de la autofagia parece consistir en la formación de una envoltura de membrana citosólica alrededor de una pequeña porción citoplasmática o un orgánulo interno (p. ej., una mitocondria). A continuación, la vesícula así formada (un **autofagosoma**) se fusiona con un lisosoma y se digieren sus contenidos (véase Fig. 10.44).

RESUMEN

RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

Retículo endoplásmico y secreción de proteínas: El retículo endoplásmico es el primer cruce de caminos en la distribución de las proteínas. En las células de los mamíferos, las proteínas destinadas a la secreción, a los lisosomas o a la membrana plasmática se traducen en los ribosomas unidos a membrana y son transferidas al RE rugoso mientras están siendo traducidas.

Marcaje de las proteínas para dirigirse al retículo endoplásmico: Las proteínas pueden dirigirse al RE bien mientras están siendo traducidas o tras haber finalizado su traducción en el citosol. En las células de mamíferos, la mayoría de las proteínas son translocadas al RE mientras están siendo traducidas en ribosomas unidos a membrana. Los ribosomas que intervienen en la síntesis de las proteínas secretadas son dirigidos al retículo endoplásmico mediante secuencias señal en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica. Las cadenas polipeptídicas en crecimiento son translocadas posteriormente al RE a través de canales proteicos, y se liberan en la luz del RE al ser escindida la secuencia señal.

Inserción de proteínas en la membrana del RE: Las proteínas integrales de membrana de la membrana plasmática o de las membranas del RE, del aparato de Golgi y de los lisosomas, se insertan inicialmente en la membrana del RE. En lugar de ser translocadas a la luz del RE, estas proteínas se anclan por hélices alfa que atraviesan la membrana y que detienen la transferencia de la cadena polipeptídica en crecimiento a través de la membrana.

Plegamiento y procesamiento de proteínas en el RE: Las cadenas polipeptídicas se pliegan en su conformación tridimensional correcta en el RE. En el RE también tiene lugar la *N*-glicosilación y la adición de los anclajes GPI.

Control de calidad en el RE: Muchas proteínas secretoras no se pliegan correctamente la primera vez. Las chaperonas detectan las proteínas plegadas incorrectamente y las reciclan a través de la vía de plegamiento. Aquellas proteínas que no pueden ser correctamente plegadas son desviadas de la vía secretora y marcadas para su degradación.

RE liso y síntesis de lípidos: El RE es el sitio principal de síntesis de lípidos en las células eucariotas, y el RE liso abunda en las células que tienen un metabolismo lipídico activo y que realizan la destoxificación de fármacos liposolubles.

Exportación de proteínas y lípidos desde el RE: Las proteínas y los lípidos son transportados en vesículas desde el RE al aparato de Golgi. Las secuencias señalizadoras intervienen en el empaquetamiento selectivo de las proteínas en vesículas que las transportarán al aparato de Golgi. Las proteínas residentes en el RE se marcan con otras secuencias señalizadoras que determinan su regreso al RE desde el Golgi a través de una vía de reciclaje.

PALABRAS CLAVE

retículo endoplásmico (RE), RE rugoso, RE de transición, RE liso, vesícula secretora, vía secretora

secuencia señal, microsoma, partícula de reconocimiento de la señal (SRP), ARN SRP, receptor SRP, translocón, peptidasa de la señal

proteína disulfuro isomerasa, anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI)

respuesta a proteínas no plegadas

flipasa

PALABRAS CLAVE

aparato de Golgi, complejo de Golgi, red *cis* del Golgi, apilamiento del Golgi, red *trans* del Golgi

glicosiltransferasa, glicosidasa, manosa-6-fosfato, región señal

dominio apical, dominio basolateral, vacuola

vesícula sináptica

clatrina, COPI, COPII, vesícula recubierta de COP, vesícula recubierta de clatrina

SNARE, Rab, exocistos

RESUMEN

APARATO DE GOLGI

Organización del Golgi: El aparato de Golgi participa en el procesamiento y en la distribución de las proteínas, así como en la síntesis de lípidos y polisacáridos. Las proteínas son transportadas desde el retículo endoplásmico a la red *cis* del Golgi. Las cisternas de la red *cis* del Golgi maduran para formar el apilamiento del Golgi, en el que tienen lugar la mayoría de las reacciones metabólicas de este aparato. Las cisternas del apilamiento y sus proteínas modificadas maduran para dar lugar a la red *trans* del Golgi, en el que se distribuyen y empaquetan las proteínas en vesículas que las transportarán hacia los endosomas, la membrana plasmática o el exterior celular.

Glicosilación de proteínas en el Golgi: Los *N*-oligosacáridos añadidos a las proteínas en el RE son modificados en el Golgi. Aquellas proteínas destinadas a los lisosomas son fosforiladas específicamente en los residuos de manosa, y la manosa-6-fosfato actúa como una señal que dirige su transporte a los lisosomas desde la red *trans* del Golgi. En el Golgi también tiene lugar la *O*-glicosilación.

Metabolismo de lípidos y de polisacáridos en el Golgi: El aparato de Golgi es el lugar donde se sintetizan los glicolípidos, la esfingomielina y los polisacáridos complejos de la pared celular vegetal.

Distribución y exportación de proteínas desde el aparato de Golgi: Las proteínas se distribuyen en la red *trans* del Golgi para ser empaquetadas en vesículas de transporte que se dirigen a ser secretadas, a la membrana plasmática, a los lisosomas o a las vacuolas de las levaduras y plantas. En las células polarizadas, las proteínas se dirigen específicamente a los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática.

MECANISMO DE TRANSPORTE DE LAS VESÍCULAS

Aproximaciones experimentales al conocimiento del transporte de las vesículas: El mecanismo de transporte de las vesículas se ha determinado mediante el estudio de mutantes de levaduras, de sistemas reconstituidos de células libres y de vesículas sinápticas, visualización del tráfico de proteínas a través de la vía secretora y análisis proteómico.

Selección de la mercancía, proteínas de revestimiento y gemación de vesículas: La superficie citoplásmica de las vesículas está recubierta de proteínas que dirigen la gemación de las vesículas. Las moléculas específicas que se transportarán se seleccionan por medio de complejos de pequeñas proteínas de unión a GTP y proteínas adaptadoras que se asocian a las proteínas de cubierta.

Fusión de las vesículas: La unión de las vesículas con la membrana diana adecuada está mediada por interacciones entre pares de proteínas transmembrana y pequeñas proteínas de unión a GTP, lo que da lugar a la fusión de las membranas. Algunos tipos de fusión con la membrana plasmática (exocitosis) tienen lugar en complejos multiproteicos específicos denominados exocistos.

RESUMEN

LISOSOMAS

Hidrolasas ácidas lisosómicas: Los lisosomas contienen una serie de hidrolasas ácidas que degradan proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos. Estas enzimas funcionan específicamente al pH ácido del interior de los lisosomas.

Endocitosis y formación de los lisosomas: Las moléculas extracelulares captadas por endocitosis son transportadas a los endosomas tempranos, que pueden madurar para formar lisosomas a medida que se traen hidrolasas ácidas desde el Golgi.

Fagocitosis y autofagia: Los lisosomas son responsables de la degradación de partículas grandes, ingeridas mediante la fagocitosis, y de la digestión gradual de los propios componentes de la célula mediante la autofagia.

PALABRAS CLAVE

lisosoma, enfermedad de depósito lisosómico

endocitosis, endosoma

fagocitosis, fagosoma, fagolisosoma, autofagia, autofagosoma

Preguntas

1. ¿Cuál era la evidencia experimental original que indicaba la vía secretora RE rugoso → aparato de Golgi → vesículas secretoras → proteína secretada?

2. ¿Cómo proporcionó la traducción *in vitro* de ARNm pruebas de la existencia de una secuencia señal que dirige a proteínas secretoras potenciales al retículo endoplásmico rugoso?

3. Compara y contrasta la translocación cotraduccional y postraduccional de las cadenas polipeptídicas en el retículo endoplásmico.

4. Sec61 es un componente crítico del canal proteico localizado en la membrana del RE. En las células mutantes para Sec61, ¿cuál es el destino de las proteínas que normalmente se localizan en el aparato de Golgi?

5. ¿Por qué los grupos de carbohidratos de las glicoproteínas están siempre expuestos en la superficie de la célula?

6. ¿Cuál sería el efecto de mutar la secuencia KDEL de una proteína residente en el RE como BiP? ¿Sería este efecto similar o distinto del que se obtendría al mutar la proteína receptora de KDEL?

7. ¿Cómo se dirige una proteína lisosómica a un lisosoma? ¿Qué efecto tendría la adición de una región señalizadora diana para un lisosoma, sobre la localización subcelular de una proteína que normalmente es citosólica? ¿Cómo afectaría a la localización de una proteína que normalmente es secretada?

8. ¿Cuál es el destino predecible de las hidrolasas ácidas lisosómicas en la enfermedad celular-I, en la que las células carecen de la enzima requerida para la formación de residuos de manosa-6-fosfato?

9. ¿Qué procesos resultan en la presencia de glicolípidos y esfingolípidos en la cara externa pero no en la interna de la bicapa de la membrana plasmática?

10. Un paciente llega a su clínica con una acumulacíon de glucocerebrósidos en sus lisosomas. ¿Cuál es su diagnóstico, y qué terapia sugeriría si el precio no es un factor limitante?

11. Los lisosomas contienen poderosas enzimas hidrolíticas, que son transportadas desde su sitio de síntesis en el RE vía el aparato de Golgi. ¿Por qué estas enzimas no dañan a los constituyentes de estos orgánulos?

12. ¿Cuál es la fuente de energía para la fusión entre las membranas diana y vesicular?

13. ¿Por qué la activación de proteínas Rab requiere la asociación con una membrana?

Bibliografía

Retículo endoplásmico

Anelli, T. and R. Sitia. 2008. Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J.* 27: 315–327. [R]

Blobel, G. and B. Dobberstein. 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* 67: 835–851. [P]

Daleke, D. L. 2007. Phospholipid flippases. *J. Biol. Chem.* 282: 821–825. [R]

D'Angelo, G., M. Vicinanza and M. A. De Matteis. 2008. Lipid-transfer proteins in biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*20: 360–370 [R]

Gilchrist, A., C. E. Au, J. Hiding, A. W. Bell, J. Fernandez-Rodriguez, S. Lesimple, H. Nagaya, L. Roy, S. J. Gosline, M. Hallett, J. Paiement, R. E. Kearney, T. Nilsson and J. J. Bergeron. 2006. Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* 127: 1265–1281. [P]

Halic, M., T. Becker, M. R. Pool, C. M. Spahn, R. A. Grassucci, J. Frank and R. Beckmann. 2004. Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature* 427: 808–814. [P]

Halic, M. and R. Beckmann. 2005. The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15: 116–125. [R]

Helenius, A. and M. Aebi. 2004. Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 1019–1049. [R]

Kent, C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 315–343. [R]

Kol, M. A., A. I. de Kroon, J. A. Killian and B. de Kruijff. 2004. Transbilayer movement of phospholipids in biogenic membranes. *Biochemistry* 43: 2673–2681. [R]

Lippincott-Schwartz, J. and W. Liu. 2006. Insights into COPI coat assembly and function in living cells. *Trends Cell Biol.* 16: e1–e4.

Mackinnon, R. 2005. Structural biology: Membrane protein insertion and stability. *Science* 307: 1425–1426. [R]

Mayor, S. and H. Riezman. 2004. Sorting GPI-anchored proteins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 110–120. [R]

Moremen, K. W. and M. Molinari. 2006. *N*-linked glycan recognition and processing: the molecular basis of endoplasmic reticulum quality control. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 592–599. [R]

Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, K. Hirschberg, K. J. Zaal and J. Lippincott-Schwartz. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389: 81–85. [P]

Rapoport, T. A. 2007. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450: 663–669. [R]

Schroder, M. and R. J. Kaufman. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Ann. Rev. Biochem.* 74: 739–789. [R]

Aparato de Golgi

Altan-Bonnet, N., R. Sougrat and J. Lippincott-Schwartz. 2004. Molecular basis for Golgi maintenance and biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 364–372. [R]

Baranski, T. J., P. L. Faust and S. Kornfeld. 1990. Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell* 63: 281–291. [P]

Chrispeels, M. J. and N. V. Raikhel. 1992. Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell* 68: 613–616. [R]

Conibear, E. and T. H. Stevens. 1995. Vacuolar biogenesis in yeast: Sorting out the sorting proteins. *Cell* 83: 513–516. [R]

de Graffenried, C. L. and C. R. Bertozzi. 2004. The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 356–363. [R]

De Matteis, M.A. and A. Luini. 2008. Exiting the Golgi complex. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 273–284. [R]

Derby, M. C. and P. A. Gleeson. 2007. New insights into membrane trafficking and protein sorting. *Int. Rev. Cytol.* 261: 47–116. [R]

Folsch, H., H. Ohno, J. S. Bonifacino and I. Mellman. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99: 189–196. [P]

Fries, E., and J. E. Rothman. 1980. Transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein in a cell-free extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3870–3874. [P]

Gilchrist, A., C. E. Au, J. Hiding, A. W. Bell, J. Fernandez-Rodriguez, S. Lesimple, H. Nagaya, L. Roy, S. J. Gosline, M. Hallett, J. Paiement, R. E. Kearney, T. Nilsson and J. J. Bergeron. 2006. Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* 127: 1265–1281. [P]

Kirchhausen, T. 2002. Clathrin adaptors really adapt. *Cell* 109: 413–416. [R]

Losev, E., C. A. Reinke, J. Jellen, D. E. Strongin, B. J. Bevis and B. S. Glick. 2006. Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* 441: 1002–1006. [P]

Matsuura-Tokita, K., M. Takeuchi, A. Ichihara, K. Mikuriya and A. Nakano. 2006. Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* 441: 1007–1010. [P]

Pearse, B. M. 1975. Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* 97: 93–98. [P]

Sarry, J. E., S. Chen, R. P. Collum, S. Liang, M. Peng, A. Lang, B. Naumann, F. Dierszinski, C. X. Yuan, M. Hippler and P. A. Rea. 2007. Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* 274: 4287–4305. [P]

Mecanismo de transporte de las vesículas

Balch, W. E., W. G. Dunphy, W. A. Braeli and J. E. Rothman. 1984. Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of *N*-acetylglucosamine. *Cell* 39: 405–416. [P]

Camonis, J. H. and M. A. White. 2005. Ral GTPases: Corrupting the exocyst in cancer cells. *Trends Cell Biol.* 15: 327–332. [R]

Gillingham, A. K. and S. Munro. 2007. The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 579–611. [R]

Gürkan, C., S. M. Stagg, P. LaPointe and W. E. Balch. 2006. The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 727–738. [R]

Hsu, S. C., D. TerBush, M. Abraham and W. Guo. 2004. The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int. Rev. Cytol.* 233: 243–265. [R]

Jahn, R., T. Lang and T. C. Sudhof. 2003. Membrane fusion. *Cell* 112: 519–533. [R]

Maxfield, F. R. and T. E. McGraw. 2004. Endocytic recycling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 121–132. [R]

Mayor, S. and H. Riezman. 2004. Sorting GPI-anchored proteins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 110–120. [R]

McMahon, H. T. and I. G. Mills. 2004. COP and clathrin-coated vesicle budding: Different pathways, common approaches. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 379–391. [R]

Novick, P., C. Field and R. Schekman. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21: 205–215. [P]

Perrais, D. and C. J. Merrifield. 2005. Dynamics of endocytic vesicle creation. *Dev. Cell* 9: 581–592. [R]

Pfeffer, S. R. 2007. Unsolved mysteries in membrane traffic. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 629–645. [R]

Quenneville, N. R. and E. Conibear. 2006. Toward the systems biology of vesicle transport. *Traffic* 7: 761–768. [R]

Rizo, J. and T. C. Südhof. 2002. SNARES and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nature Rev. Neurosci.* 3: 641–653. [R]

Rodriguez-Boulan, E., G. Kreitzer and A. Musch. 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 233–247. [R]

Söllner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318–324. [P]

Sorensen, J. B. 2005. SNARE complexes prepare for membrane fusion. *Trends Neurosci.* 28: 453–455. [R]

Sorkin, A. 2004. Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: A team effort. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 392–399. [R]

Stagg, S. M., P. LaPointe, and W. E. Balch. 2007. Structural design of cage and coat scaffolds that direct membrane traffic. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17: 221–228. [R]

Lisosomas

Cuervo, A. M. 2004. Autophagy: In sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 14: 70–77. [R]

Forgac, M. 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 917–929. [R]

Fukuda, M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 266: 21327–21330. [R]

Ghosh, P., N. M. Dahms and S. Kornfeld. 2003. Mannose 6-phosphate receptors: New twists in the tale. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 202–213. [R]

Luzio, J. P., P. R. Pryor and N. A. Bright. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 622–632. [R]

Neufeld, E. F. 1991. Lysosomal storage diseases. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 257–280. [R]

CAPÍTULO 11

Bioenergética y metabolismo
Mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas

LOS ORGÁNULOS CITOPLÁSMICOS, ADEMÁS DE ESTAR IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE Y DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS, proporcionan compartimentos especializados en los que tienen lugar diversas actividades metabólicas. Una actividad fundamental de todas las células es generar energía metabólica, y son dos los orgánulos que están dedicados específicamente al metabolismo energético y a la producción de ATP. Las mitocondrias son responsables de generar la mayoría de la energía útil derivada de la degradación de los lípidos y de los carbohidratos, y los cloroplastos utilizan la energía obtenida de la luz solar para generar tanto ATP como poder reductor para sintetizar carbohidratos a partir de CO_2 y H_2O. El tercer orgánulo que se trata en este capítulo, el peroxisoma, contiene enzimas que intervienen en diversas rutas metabólicas, incluyendo la degradación de los ácidos grasos y el metabolismo derivado de la fotosíntesis.

Las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas difieren de los orgánulos tratados en el capítulo anterior no sólo en sus funciones, sino también en su mecanismo de formación. Las proteínas destinadas a las mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas, en lugar de sintetizarse en los ribosomas unidos a membrana y ser trasladadas al retículo endoplásmico, se sintetizan en los ribosomas libres del citosol y son importadas a sus orgánulos de destino en forma de cadenas polipeptídicas completas. Las mitocondrias y los cloroplastos también contienen sus propios genomas, que incluyen algunos genes que se transcriben y traducen en el propio orgánulo. Por tanto, la distribución de las proteínas a los orgánulos citoplásmicos tratados en este capítulo es diferente de las rutas de transporte vesicular que conectan el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y la membrana plasmática.

Mitocondrias

Las **mitocondrias** desempeñan un papel crucial en la generación de energía metabólica en las células eucariotas. Como ya se comentó en el Capítulo 3, son responsables de la mayor parte de la energía útil derivada de la degradación de los carbohidratos y de los ácidos grasos, que es convertida en ATP por el proceso de la fosforilación oxidativa. La mayoría de las proteínas mitocondriales son traducidas en los ribosomas citoplásmicos libres, y son importadas al orgánulo debido a señales directoras específicas. Además, las mitocondrias son únicas entre los orgánulos citoplásmicos ya trata-

dos en que contienen su propio ADN, que codifica ARNt, ARNr, y algunas proteínas mitocondriales. El ensamblaje de las mitocondrias implica, por tanto, a proteínas codificadas por su genoma propio y traducidas en el orgánulo, así como a proteínas codificadas por el genoma nuclear e importadas desde el citosol.

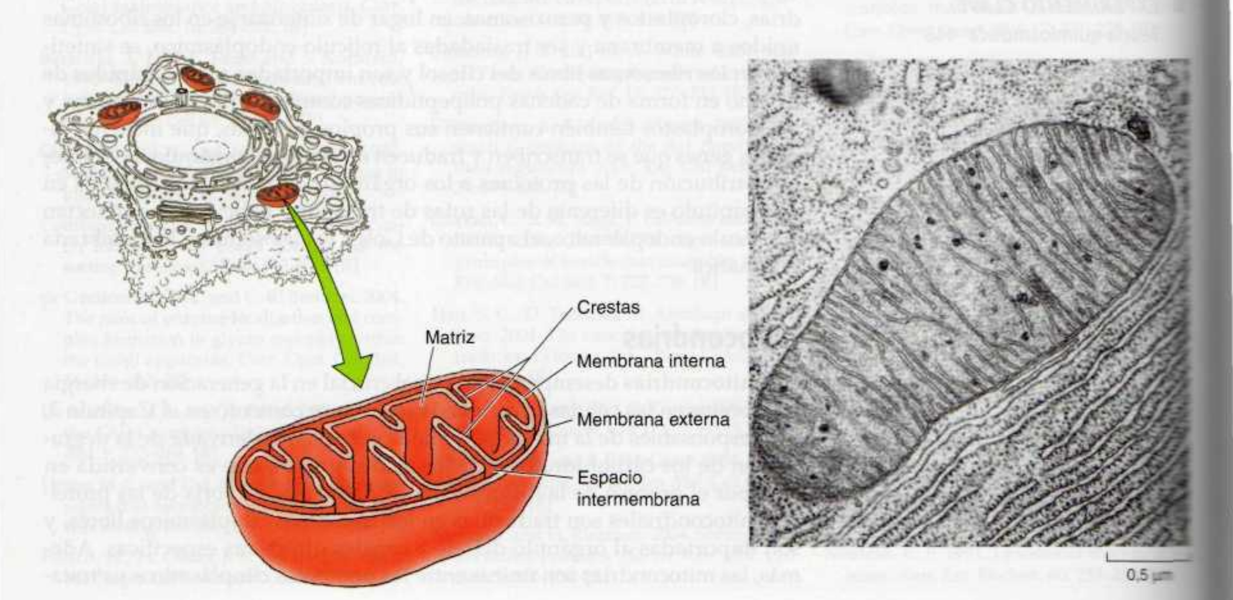
Organización y función de las mitocondrias

Las mitocondrias están rodeadas por un sistema de doble membrana, constituido por una membrana mitocondrial interna y otra externa separadas por un espacio intermembrana (Fig. 11.1). La membrana interna forma numerosos pliegues (**crestas**), que se extienden hacia el interior (**o matriz**) del orgánulo. Cada uno de estos componentes desempeña un papel funcional distinto, siendo la matriz y la membrana interna los principales compartimentos funcionales de las mitocondrias.

La matriz contiene el sistema genético mitocondrial así como las enzimas responsables de las reacciones centrales del metabolismo oxidativo (Fig. 11.2). Como ya se trató en el Capítulo 3, la fuente principal de energía metabólica en las células animales es la degradación oxidativa de la glucosa y de los ácidos grasos. Las etapas iniciales del metabolismo de la glucosa (glicólisis) tienen lugar en el citoplasma, donde la glucosa es convertida a piruvato (véase Fig. 3.11). El piruvato es posteriormente transportado al interior de la mitocondria, donde su oxidación completa a CO_2 produce la mayor parte de la energía utilizable (ATP) procedente del metabolismo de la glucosa. Esto implica la oxidación inicial del piruvato a acetil CoA, que posteriormente es degradado hasta CO_2 a través del ciclo del ácido cítrico (véanse Figs. 3.12 y 3.13). La oxidación de los ácidos grasos también produce acetil CoA (véase Fig. 3.15), que de forma similar es metabolizado por el ciclo del ácido cítrico en las mitocondrias. Por tanto, las enzimas del ciclo del ácido cítrico (localizadas en la matriz mitocondrial) tienen un papel central en la degradación oxidativa tanto de los carbohidratos como de los ácidos grasos.

La oxidación del acetil CoA a CO_2 está acoplada a la reducción de NAD^+ y FAD a NADH y $FADH_2$ respectivamente. Por tanto, la mayor parte de la energía derivada del metabolismo oxidativo es producida por el proceso de

Figura 11.1 Estructura de una mitocondria. Las mitocondrias están rodeadas por un sistema de doble membrana, constituido por una membrana interna y una externa. Los pliegues de la membrana interna (crestas) se extienden hacia el interior de la matriz. (Microfotografía por K. R. Porter/Photo Rechearches, Inc.)



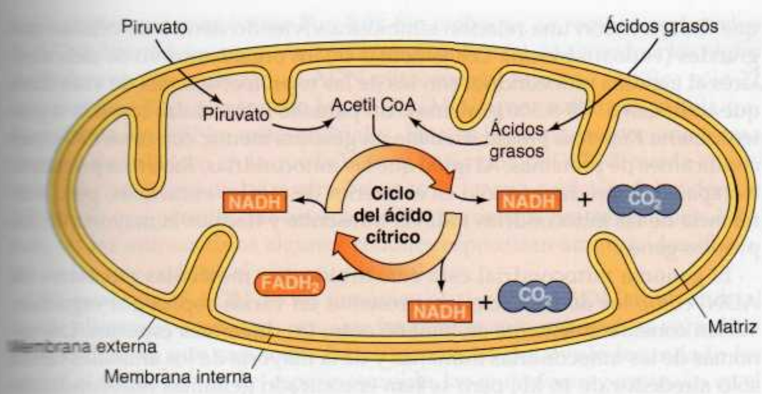


Figura 11.2 Metabolismo en la matriz de las mitocondrias. El piruvato y los ácidos grasos son importados desde el citosol y convertidos en acetil CoA en la matriz mitocondrial. El acetil CoA se oxida a CO_2 a través del ciclo del ácido cítrico, la ruta principal del metabolismo oxidativo.

fosforilación oxidativa (que se tratará en detalle en la siguiente sección), que tiene lugar en la membrana mitocondrial interna. Los electrones de alta energía del NADH y $FADH_2$ se transfieren al oxígeno molecular a través de una serie de transportadores de la membrana. La energía derivada de estas reacciones de transferencia de electrones se convierte en energía potencial acumulada en forma de un gradiente de protones a través de la membrana, que es utilizada para dirigir la síntesis de ATP. La membrana interna mitocondrial representa de esta manera el lugar principal de generación de ATP, y este papel fundamental se refleja en su estructura. Primero, el incremento de su superficie mediante su plegamiento en crestas. Además, la membrana interna mitocondrial contiene una proporción inhabitualmente elevada (más del 70%) de proteínas, que intervienen en la fosforilación oxidativa así como en el transporte de metabolitos (p. ej., piruvato y ácidos grasos) entre el citosol y la mitocondria. Por otra parte, la membrana interna es impermeable a la mayoría de los iones y de las moléculas pequeñas —una propiedad crítica para mantener el gradiente de protones que dirige la fosforilación oxidativa.

A diferencia de la membrana interna, la membrana externa mitocondrial es completamente permeable a las moléculas pequeñas. Esto es debido a que contiene unas proteínas denominadas **porinas**, que forman canales que permiten la difusión libre de moléculas menores de 1.000 daltons. Por tanto, la composición del espacio intermembrana es similar a la del citosol respecto a los iones y a las moléculas pequeñas. Consecuentemente, la membrana mitocondrial interna es la barrera funcional para el paso de moléculas pequeñas entre el citosol y la matriz y mantiene el gradiente de protones que dirige la fosforilación oxidativa.

La viabilidad de la célula depende del funcionamiento eficaz de las mitocondrias, ya que constituyen las principales fuentes de energía celular. En muchos tipos celulares, las mitocondrias han de localizarse en la proximidad de áreas de gran consumo de energía, como las sinapsis neuronales. Por otra parte, las mitocondrias no son orgánulos estáticos, sino que se fusionan continuamente entre sí y se dividen en dos. Estos acontecimientos continuos de *fusión y fisión suponen la remodelación de la red celular* de mitocondrias e inciden tanto en el funcionamiento como en la morfología de estos orgánulos. No se ha definido adecuadamente la importancia que revisten la fusión y la fisión, aunque es posible que permitan el intercambio de material genético entre las mitocondrias de una misma célula.

Sistema genético de las mitocondrias

Las mitocondrias contienen su propio sistema genético, el cual está separado y es distinto del genoma nuclear de la célula. Como ya se comentó en el Capítulo 1, se cree que las mitocondrias evolucionaron a partir de bacterias

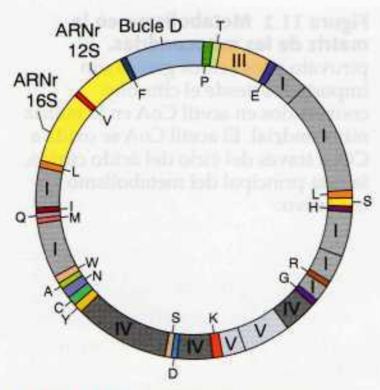


Figura 11.3 Genoma mitocondrial humano. El genoma contiene 13 secuencias codificadoras de proteínas, que son designadas como componentes de los complejos respiratorios I, III, IV o V. Además, el genoma contiene genes para los ARNr 12S y 16S y para 22 ARNt, que son designados por el código de una letra para el aminoácido correspondiente. La región del genoma designada «bucle D» contiene un origen de replicación del ADN y secuencias promotoras de la transcripción.

que desarrollaron una relación simbiótica viviendo dentro de células más grandes (**endosimbiosis**). Los genomas de los organismos vivos más similares al genoma mitocondrial son los de las α-proteobacterias de vida libre, que codifican 6.700-8.300 proteínas. Un parásito intracelular como la α-proteobacteria *Rickettsia prowazekii* tiene un genoma menor, con unos 830 genes codificantes de proteínas. Al igual que las mitocondrias, *Rickettsia prowazekii* es capaz de reproducirse sólo en el interior de células eucariotas, pero a diferencia de las mitocondrias todavía transcribe y traduce la mayoría de sus propios genes.

El genoma mitocondrial está constituido por moléculas circulares de ADN, como los de las bacterias, presentes en varias copias por orgánulo. Varían considerablemente en tamaño entre las diferentes especies. Los genomas de las mitocondrias humanas y de la mayoría de los animales tienen sólo alrededor de 16 kb, pero se han encontrado genomas mitocondriales sustancialmente más grandes en las levaduras (aproximadamente 80 kb) y en las plantas (más de 200 kb). Sin embargo, estos genomas mitocondriales más grandes están compuestos fundamentalmente por secuencias no codificantes y no parece que contengan mucha más información genética. Por ejemplo, el genoma mitocondrial más grande secuenciado es el de la planta *Arabidopsis thaliana*. Aunque el ADN mitocondrial de *Arabidopsis* tiene alrededor de 367 kb, codifica sólo 31 proteínas: un poco más del doble de las que codifica el ADN mitocondrial humano. El ADN mitocondrial con mayor número de genes es el del protozoo *Reclinomonas americana*, que tiene 69 kb y contiene 67 genes. El genoma mitocondrial más pequeño es el del protista *Plasmodium falciparium*, que es de 6 kb y codifica para tan sólo 3 proteínas. Por el contrario, los genomas de las α-proteobacterias de vida libre son de 7-10 Mb. La mayoría de los genomas mitocondriales actuales codifican un número pequeño de proteínas que son componentes esenciales para el sistema de fosforilación oxidativa. Además, el genoma mitocondrial codifica todos los ARN ribosómicos y la mayoría de los ARN de transferencia necesarios para la traducción en la mitocondria de estas secuencias codificantes. Otras proteínas mitocondriales son codificadas por genes nucleares; se piensa que éstas han sido transferidas al núcleo desde el genoma mitocondrial ancestral.

El genoma mitocondrial humano codifica 13 proteínas implicadas en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa (Fig. 11.3). Además, el ADN mitocondrial humano codifica ARNr 16S y 12S y 22 ARNt que se requieren para la traducción de las proteínas codificadas por el genoma del orgánulo. Los dos ARNr son los únicos componentes de ARN de los ribosomas mitocondriales de los animales y levaduras, mientras que los ribosomas bacterianos contienen tres ARNr (23S, 16S y 5S). Sin embargo, el ADN mitocondrial de las plantas también codifica un tercer ARNr de 5S. Las mitocondrias de las plantas y de los protozoos también difieren de las de los animales en que importan y utilizan ARNt codificados tanto por el genoma nuclear como por el mitocondrial, mientras que en las mitocondrias animales todos los ARNt son codificados por el orgánulo.

El pequeño número de ARNt codificados por el genoma mitocondrial pone de manifiesto una característica importante del sistema genético mitocondrial —el uso de un código genético ligeramente diferente, que es distinto del código genético «universal» utilizado por las células procariotas y eucariotas (Tabla 11.1)—. Como ya se trató en el Capítulo 4, hay 64 codones posibles, de los cuales 61 codifican los 20 aminoácidos diferentes incorporados en las proteínas (véase Tabla 4.1). Muchos ARNt tanto en las células procariotas como en las eucariotas son capaces de reconocer más de un único codón en el ARNm debido al «balanceo», que permite el desapareamiento entre el anticodón del ARNt y la tercera posición de determinados codo-

Tabla 11.1 Diferencias entre los códigos genéticos universal y mitocondrial

Codón	Código universal	Código mitocondrial humano
UGA	Terminación	Trp
AGA	Arg	Terminación
AGG	Arg	Terminación
AUA	Ile	Met

En las mitocondrias de las levaduras y las plantas hay otros codones del código universal.

nes complementarios (véase Fig. 8.3). Sin embargo, se requieren al menos 30 ARNt diferentes para traducir el código universal de acuerdo a las reglas del balanceo. Sin embargo, el ADN mitocondrial humano codifica sólo 22 especies de ARNt, y estos son los únicos ARNt que se utilizan para la traducción de los ARNm mitocondriales. Esto se lleva a cabo por una forma extrema de balanceo en la que la U en el anticodón del ARNt puede aparearse con cualquiera de las cuatro bases en la tercera posición del codón de ARNm, lo que permite que un único ARNt reconozca cuatro codones. Además, en las mitocondrias algunos codones especifican aminoácidos distintos de los que codifica el código universal.

Al igual que el ADN de los genomas nucleares, el ADN mitocondrial puede alterarse por mutaciones, que frecuentemente son nocivas para el organismo. Puesto que casi todas las mitocondrias del óvulo fecundado las aporta el oocito en vez del espermatozoide, las mutaciones germinales en el ADN mitocondrial son transmitidas a la siguiente generación por la madre. Dichas mutaciones se han asociado con varias enfermedades. Las mutaciones en un gen de ARNt mitocondrial se asocian con el síndrome metabólico, la condición humana asociada con la obesidad y la diabetes. Por ejemplo, la neuropatía óptica hereditaria de Leber, una enfermedad que conduce a la ceguera, puede producirse por mutaciones en los genes mitocondriales que codifican los componentes de la cadena de transporte de electrones. Además, se ha sugerido que la acumulación progresiva de mutaciones en el ADN mitocondrial durante la vida de los individuos contribuye al proceso de envejecimiento.

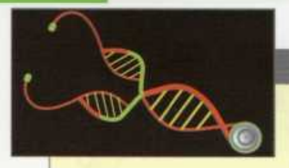
■ **Puesto que casi todas las mitocondrias son heredadas de la madre, es posible determinar el linaje materno humano hasta nuestro ancestro femenino común más reciente: Eva mitocondrial.**

Al contrario que el genoma mitocondrial, las proteínas presentes en las mitocondrias son mucho más desconocidas. Las mitocondrias de mamíferos se cree que contienen entre 1.000 y 1.500 proteínas diferentes, representando ~5% de las proteínas codificadas por los genomas de mamífero. Sin embargo, casi la mitad de todas las proteínas mitocondriales siguen sin identificarse. Por otra parte, las mitocondrias pertenecientes a tejidos diferentes contienen proteínas distintas, de modo que una proporción menor del 50% de las proteínas de las mitocondrias está presente en todos los tejidos en el ser humano. Algunas de estas diferencias pueden originarse por funciones tejido específicas de las mitocondrias, como la compleja síntesis de esteroides en las células adrenales o la biosíntesis del grupo hemo en la médula ósea; otras probablemente jueguen papeles en procesos poco conocidos como el control de la morfología o el número mitocondrial, y la herencia mitocondrial.

Internalización de proteínas y formación de las mitocondrias

A diferencia de lo que sucede con los ARN miembros del aparato de traducción de las mitocondrias (ARNr y ARNt), la mayoría de los genomas mitocondriales no codifican las proteínas requeridas para la replicación, transcripción o traducción del ADN. Los genes que codifican las proteínas requeridas para la replicación y expresión del ADN mitocondrial se encuentran en el núcleo. Además, el núcleo contiene los genes que codifican la mayoría de las proteínas mitocondriales requeridas para la fosforilación oxidativa y todas las enzimas que intervienen en el metabolismo mitocondrial (p. ej., las enzimas del ciclo del ácido cítrico). Algunos de estos genes fueron transferidos al núcleo desde el ancestro procariota original de las mitocondrias.

Aproximadamente 1.000 proteínas codificadas por los genes nucleares (más del 95% de las proteínas mitocondriales) son sintetizadas en ribosomas citosólicos libres e importadas en las mitocondrias como cadenas polipeptídicas completadas. Debido a la estructura de doble membrana de las mitocondrias, el importe de proteínas es considerablemente más complicado que la transferencia de un polipéptido a través de una bicapa fosfo-



MEDICINA MOLECULAR

Enfermedades de las mitocondrias: neuropatía óptica hereditaria de Leber

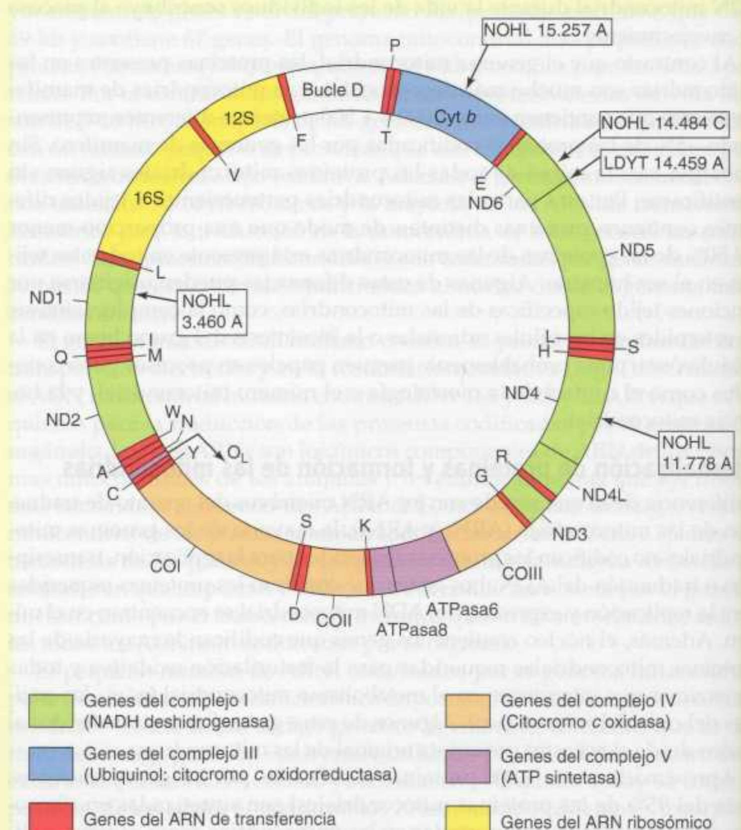
Enfermedad

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) es una enfermedad hereditaria poco frecuente que causa ceguera como consecuencia de la degeneración del nervio óptico. La pérdida de la visión suele ocurrir entre los 15 y los 35 años, y generalmente es la única manifestación de la enfermedad. No todos los individuos que heredan los defectos genéticos responsables de la NOHL desarrollan la enfermedad, y ésta afecta con menor frecuencia a las mujeres que a los hombres. Esta tendencia a afectar a los hombres podría sugerir que la NOHL es una enfermedad ligada al cromosoma X. Sin embargo, esto no es así, ya que los hombres nunca transmiten la NOHL a su descendencia. Por el contrario, la NOHL siempre es transmitida por la madre. Esta característica concuerda con una herencia de la NOHL citoplásmica en lugar de nuclear, ya que el citoplasma de los óvulos fecundados procede casi por completo del oocito.

Bases moleculares y celulares

En 1988 Douglas Wallace y sus colaboradores identificaron una mutación en el ADN mitocondrial de los pacientes con NOHL. Esta mutación (en el par de bases 11.778) afecta a una de las subunidades del complejo I de la cadena de transporte de electrones (NADH deshidrogenasa), y causa la sustitución de una histidina por una arginina. La mutación 11.778 es responsable de cerca de la mitad de todos los casos de NOHL. Otras tres mutaciones del ADN mitocondrial han sido también identificadas como causas primarias de la NOHL. Dos de estas mutaciones afectan a otras subunidades del complejo I, mientras que la tercera afecta al citocromo *b*, que es un componente del complejo III (véase figura). En total, estas cuatro mutaciones son responsables de más del 80% de los casos de NOHL. Una quinta mutación (en el par de bases 14.459), que afecta a una subunidad del complejo I, puede producir NOHL o enfermedades musculares.

Las mutaciones que producen la NOHL disminuyen la capacidad de las mitocondrias para llevar a cabo la fosforilación oxidativa y generar ATP. Esto tiene su efecto principal en aquellos tejidos que son más dependientes de la fosforilación oxidativa, por lo que las alteraciones en los componentes de las mitocondrias darán lugar a manifestaciones clínicas en órganos específicos, en vez de a una enfermedad sistémica. El sistema nervioso central (incluyendo el cerebro y el nervio óptico) es muy dependiente del metabolismo oxidativo, por lo que concuerda que la ceguera sea la principal manifestación clínica de NOHL. Como ya se ha mencionado, la herencia de mutaciones de la NOHL no siempre conduce al desarrollo de la enfermedad; sólo alrededor del 10% de las mujeres y el 50% de los hombres que poseen una mutación sufren la pérdida de la visión. Un factor que puede contribuir a esta baja incidencia de la enfermedad entre los portadores de las mutaciones de la NOHL es que cada célula contiene miles de copias del ADN mitocondrial, que pueden estar presentes en una mezcla de mitocondrias mutantes y normales.



NOHL mutaciones en el ADN mitocondrial.

MEDICINA MOLECULAR

Estas mitocondrias se distribuyen de manera aleatoria a las células hijas en la división celular, por lo que la población de mitocondrias puede cambiar a medida que las células se dividen, dando lugar a células que contienen proporciones mayores o menores de orgánulos mutantes. Sin embargo, muchos individuos que portan predominantemente ADN mitocondriales mutantes tampoco desarrollan la enfermedad. Por tanto, parece que otros factores genéticos o ambientales, que aún no han sido identificados, desempeñan un papel significativo en el desarrollo de la NOHL.

Prevención y tratamiento

La identificación de las mutaciones del ADN mitocondrial responsables de la NOHL permite el diagnóstico molecular de la enfermedad, el cual puede ser importante para establecer un diagnóstico definitivo de los pacientes sin antecedentes familiares. Sin embargo, la detección de mutaciones en el ADN mitocondrial es de escaso valor para localizar a los miembros de las familias afectadas o para una planificación familiar. Esto contrasta con la utilidad para detectar mutaciones congénitas de los genes nucleares, donde el análisis molecular puede determinar si un miembro de la familia o un embrión ha heredado un alelo mutante o normal. En la NOHL, sin embargo, las mitocondrias mutantes están presentes en un número elevado y son transmitidas por vía materna a todos los descendientes. Como ya se ha dicho, no todos los descendientes desarrollan la enfermedad, pero esto no puede predecirse mediante el análisis genético.

El hallazgo de que la NOHL está producida por mutaciones del ADN mitocondrial hace pensar en el potencial de nuevos tratamientos. Una aproximación es el tratamiento metabólico dirigido a mejorar la fosforilación oxidativa mediante la administración de sustratos o cofactores de la vía de transporte de electrones, como succinato o coenzima Q. Otra posibilidad que se ha considerado para el tratamiento de la NOHL es la terapia génica mediante la que se colocaría un alelo de un gen normal en el núcleo. Se añadiría una señal apropiada para dirigir el producto del gen a la mitocondria, donde podría sustituir a la proteína codificada por la mitocondria defectuosa.

Referencias

Brown, M. D., D. S. Voljavec, M. T. Lott, I. MacDonald and D. C. Wallace. 1992. Leber's hereditary optic neuropathy: A model for mitochondrial neurodegenerative diseases. *FASEB J.* 6: 2791–2799.

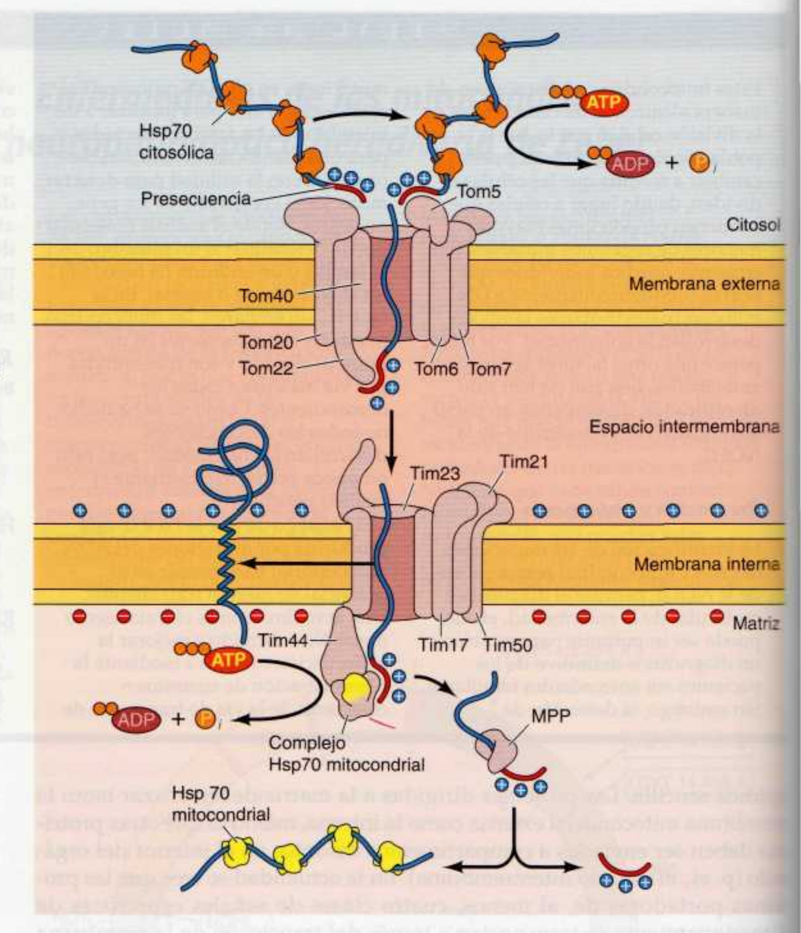
Howell, N., J. L. Elson, P. F. Chinnery and D. M. Turnbull. 2005. mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders. *Trends Genet.* 21: 583–586.

Riordan-Eva, P. and A. E. Harding. 1995. Leber's hereditary optic neuropathy: The clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *J. Med. Genet.* 32: 81–87.

lipídica sencilla. Las proteínas dirigidas a la matriz deben cruzar tanto la membrana mitocondrial externa como la interna, mientras que otras proteínas deben ser enviadas a compartimentos distintos en el interior del orgánulo (p. ej., el espacio intermembrana). En la actualidad se cree que las proteínas portadoras de, al menos, cuatro clases de señales específicas de direccionamiento se transportan a través del translocón de la membrana mitocondrial externa a los distintos compartimentos de este orgánulo.

La internalización de proteínas a la matriz es el aspecto mejor conocido de la distribución de las proteínas en la mitocondria (Fig. 11.4). La mayoría de las proteínas son marcadas a la matriz y dirigidas a la mitocondria mediante secuencias amino terminales de 20 a 35 aminoácidos (denominadas **presecuencias**) que se escinden por rotura proteolítica tras entrar en el orgánulo. Las presecuencias de las proteínas mitocondriales, caracterizadas por primera vez por Gottfried Schatz, contienen múltiples residuos de aminoácidos con carga positiva, habitualmente en forma de hélice α anfipática. El primer paso en la internalización de la proteína es la unión de estas presecuencias a receptores en la superficie de la mitocondria. A continuación la cadena polipeptídica se inserta en un complejo proteínico que dirige la translocación a través de la membrana externa (la translocasa de la membrana externa o **complejo Tom**). Las proteínas Tom individuales se designan de acuerdo con su tamaño molecular, de modo que los receptores se denominan Tom20, Tom22 y Tom5. Desde estos receptores, las proteínas son transferidas a la proteína del poro Tom40 y son translocadas a través de la membrana externa. Las proteínas son transferidas a continuación a un segundo complejo proteico en la membrana interna (una de dos translocasas diferentes de la membrana interna o **complejos Tim**). La mayoría de las proteínas con presecuencias atraviesan la membrana interna a través del complejo Tim23 aunque algunas, dotadas de una segunda hidrofóbica de

Figura 11.4 Internalización de proteínas de la matriz mitocondrial. Las proteínas se dirigen al complejo Tom en la membrana mitocondrial externa por presecuencias aminoterminales que poseen aminoácidos cargados positivamente. Esta presecuencia se une en primer lugar a Tom20, y a continuación se transfiere a Tom5 y el poro de internalización, Tom40. Después de atravesar la membrana externa, la presecuencia se une al dominio intermembrana de Tom22 y pasa Tim50 o Tim21 al complejo Tim23 en la membrana interna. En la matriz, una chaperona Hsp70 asociada con Tim44 actúa como motor, empleando la hidrólisis de ATP para translocar la proteína a través de la membrana interna. En la mayoría de las proteínas destinadas para la matriz mitocondrial, se elimina la presecuencia por una peptidasa procesadora de la matriz (MPP) y se asocian con proteínas Hsp70 solubles que facilitan su plegamiento.



direccionamiento, salen lateralmente del canal del complejo Tim23 para in- sertarse en la membrana interna. La translocación de proteínas requiere el potencial electroquímico que se establece a través de la membrana interna mitocondrial durante el transporte de electrones. Como se verá en la siguiente sección de este capítulo, la transferencia de electrones de alta energía desde el NADH y $FADH_2$ al oxígeno molecular está acoplada a la transferencia de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Puesto que los protones son partículas cargadas, esta transferencia establece un potencial eléctrico a través de la membrana interna, siendo la matriz negativa. Durante la internalización de las proteínas, este potencial eléctrico dirige la translocación de la presecuencia cargada positivamente.

Para ser trasladadas a través de la membrana mitocondrial, las proteínas deben estar, al menos parcialmente, desplegadas. Por tanto, la internalización de las proteínas en las mitocondrias requiere chaperonas moleculares además de las proteínas de membrana implicadas en la translocación (véase Fig. 11.4). En el lado citoplásmico, los miembros de la familia de chaperonas Hsp70 mantienen las proteínas parcialmente desplegadas y las presentan a la translocasa para que puedan ser insertadas en la membrana mitocondrial. A medida que cruzan la membrana interna, las cadenas polipeptídicas sin plegar se unen a otro miembro de la familia Hsp70, que está asociado con el

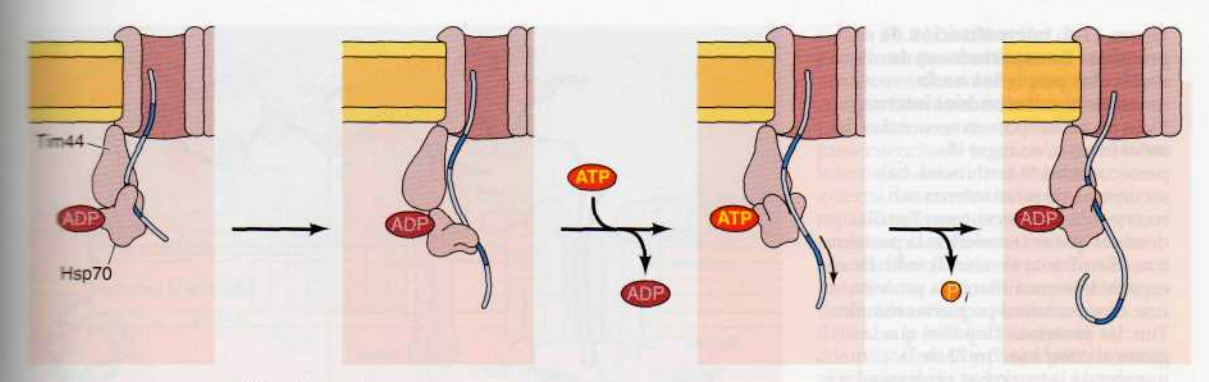


Figura 11.5 Ciclo de unión de una chaperona Hsp70. Las chaperonas Hsp70 proporcionan la fuerza para translocar las proteínas a través de las diversas membranas. Para esto explotan su capacidad de unirse de forma reversible a secuencias cortas hidrofóbicas presentes en los polipéptidos y, una vez unidas a otras estructura como Tim44, pueden actuar como un trinquete. En el estado unido a ADP, el bolsillo de unión para la proteína sustrato está cerrado y la secuencia hidrofóbica del polipéptido unida con fuerza. El desplazamiento del ADP por ATP abre el bolsillo, permitiendo a la Hsp70 liberar el polipéptido. El reconocimiento por parte de una segunda secuencia hidrofóbica resulta en la hidrólisis de ATP por parte de Hsp70, lo que cierra el bolsillo y une fuertemente al polipéptido.

complejo Tim23 y actúa como un motor que emplea la hidrólisis repetida de ATP para conducir la internalización de proteínas (Fig. 11.5). En la mayoría de los casos, la presecuencia es entonces escindida por una **peptidasa procesadora de la matriz (MPP: *matrix processing peptidase*)** y la cadena polipeptídica se une a otras chaperonas Hsp70 de la matriz que facilitan su plegamiento. Algunos polipéptidos se transfieren a continuación a una chaperona de la familia Hsp60 (una chaperonina, véase Fig. 8.24), en cuyo interior se producen plegamientos proteicos adicionales. Estas interacciones de cadena polipeptídicas con chaperonas moleculares dependen de ATP, de modo que la internalización de proteínas requiere ATP tanto fuera como en el interior de las mitocondrias, además del potencial eléctrico a través de la membrana interna.

Como se ha mencionado previamente, algunas proteínas mitocondriales se dirigen a la membrana externa, a la membrana interna o al espacio intermembrana en lugar de a la matriz, por lo que se requieren mecanismos adicionales para dirigir estas proteínas al compartimento submitocondrial correcto. Muchas de las proteínas de la membrana interna son transportadoras de moléculas pequeñas que son proteínas transmembrana multipase que intercambian nucleótidos e iones entre la mitocondria y el citosol. Estas proteínas no contienen presecuencias, por el contrario poseen múltiples secuencias de internalización en la mitocondria interna. En consecuencia, no son reconocidas por Tom20. Estas proteínas de la membrana interna, en asociación con una chaperona Hsp90, son reconocidas por un receptor distinto en la membrana mitocondrial externa (Tom70), y a continuación son translocadas por la membrana a través de Tom40 (Fig. 11.6). En el espacio intermembrana, las proteínas son reconocidas por componentes móviles de un complejo Tim diferente, el complejo Tim22. Estas proteínas Tim pequeñas (denominadas proteínas *Tiny Tim*) funcionan como chaperonas y como transportadoras que escoltan proteínas hasta Tim22. A continuación, estas proteínas son parcialmente translocadas a través de Tim22, antes de que señales internas de detención de la transferencia causen su salida lateral del poro de Tim22 y su inserción en la membrana interna.

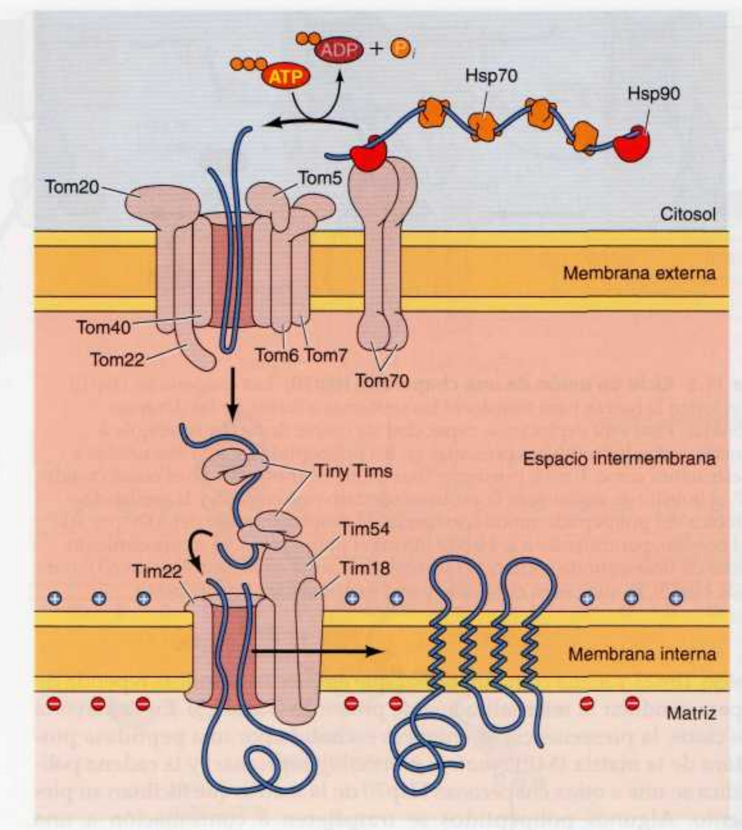


Figura 11.6 Internalización de proteínas transportadoras de moléculas pequeñas en la membrana mitocondrial interna. Estas proteínas poseen secuencias de señal interna, en lugar de presecuencias N-terminales. Las secuencias de señal interna son reconocidas por receptores Tom70, desde el que es transferida la proteína transmembrana al canal Tom40. En el espacio intermembrana, la proteína se une a las proteínas pequeñas móviles Tim, las proteínas *Tiny Tim*, que la guían al complejo Tim22 de la membrana interna. Las proteínas *Tiny Tim* transfieren la proteína a Tim54 y a continuación, al poro de internalización de Tim22. Las secuencias internas de detención de la transferencia detienen la translocación y la proteína se transfiere lateralmente al interior de la membrana mitocondrial interna.

Otras proteínas con destino en la membrana externa, interna o el espacio intermembrana poseen tanto una señal presecuencia como una secuencia de señal interna. Puesto que contienen presecuencias, estas proteínas son reconocidas por los receptores Tom20 en la membrana externa y translocadas a través del canal Tom40 (Fig. 11.7). Algunas de estas proteínas con dominios transmembrana de α-hélices salen del complejo canal Tom40 lateralmente. Otras proteínas con secuencias señal complejas pasan a través de la membrana externa debido a que son reconocidas por chaperonas específicas para cisteína, pero permanecen en el espacio intermembrana en lugar de entrar en Tim23. Otras proteínas destinadas al espacio intermembrana, además de algunas proteínas de la membrana interna, son transportadas en primer lugar a través de la membrana interna a la matriz mitocondrial a través del complejo Tim23. A continuación, son marcadas para su posterior transporte con una segunda señal que se descubre tras la eliminación de la presecuencia en la matriz. Esta segunda señal las dirige a una tercera translocasa, Oxa1, donde pasan al interior al espacio intermembrana o son detenidas en su tránsito por señales de detención de la transferencia e insertadas en la membrana interna. Oxa1 es también la translocasa para aquellas proteínas intermembrana y de la membrana interna codificadas por el genoma mitocondrial, que son sintetizadas en los ribosomas mitocondriales de la matriz. Por último, muchas proteínas de la membrana externa, como Tom40 y las proteínas con barril β (como las porinas), salen hacia el espacio intermembrana a través del complejo Tom (Fig. 11.8), donde son reconoci-

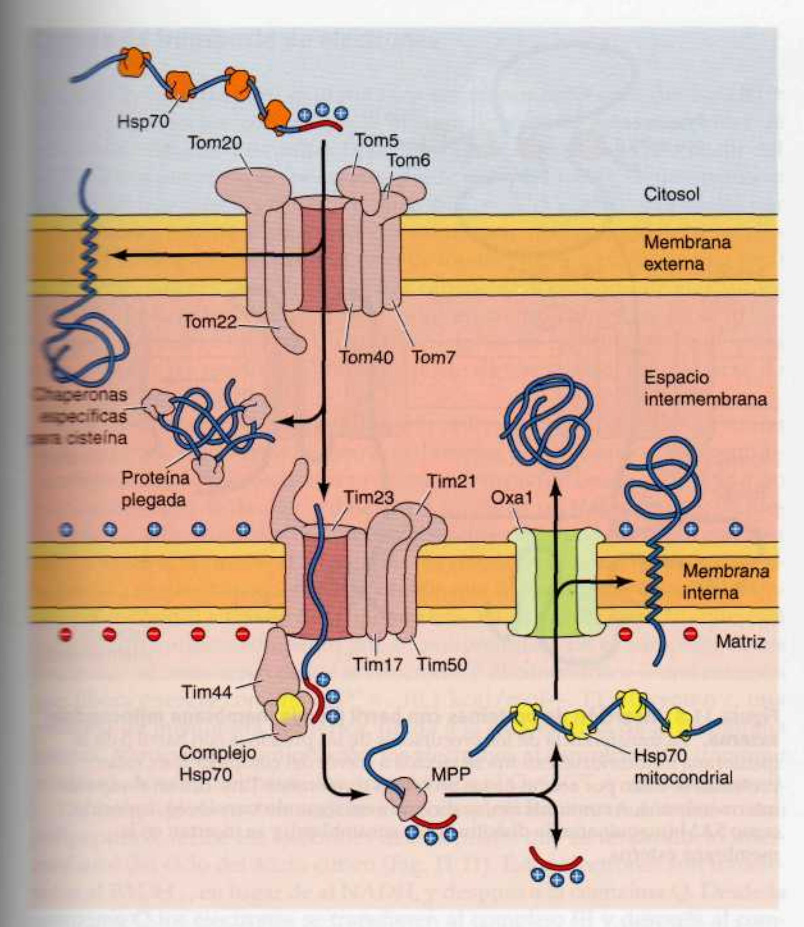


Figura 11.7 Distribución de proteínas que contienen presecuencias a los distintos compartimentos mitocondriales. Las proteínas mitocondriales con presecuencias N-terminales pueden ser internalizadas en la membrana externa, la membrana interna o el espacio intermembrana. Las presecuencias de estas proteínas son reconocidas por el receptor Tom20 y transferidas a Tom40. Las proteínas destinadas a la membrana externa detienen la translocación en el complejo Tom40 y pasan lateralmente al interior de la membrana. Algunas proteínas destinadas al espacio intermembrana son translocadas a través de Tom40, pero son reconocidas por chaperonas específicas para cisteína, permanecen en el espacio intermembrana en lugar de interaccionar con el complejo Tim23. Otras proteínas son transferidas a través de Tim23 a la matriz mitocondrial. La eliminación de la presecuencia en el interior de la matriz deja expuesta una segunda señal que dirige a estas proteínas de nuevo a la membrana interna o el espacio intermembrana a través del poro de translocación Oxa1.

das por las proteínas Tiny Tim y transportadas hacia un segundo complejo translocón, denominado SAM (maquinaria de distribución y ensamblaje), desde el cual se insertan en la membrana externa.

No sólo las proteínas, sino también los fosfolípidos de las membranas mitocondriales son importados desde el citosol. En las células animales, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina se sintetizan en el RE y se transportan a las mitocondrias mediante **proteínas de transferencia de fosfolípidos**, que extraen moléculas aisladas de fosfolípidos de la membrana del RE. Entonces el lípido puede transportarse a través del ambiente acuoso del citosol, protegido por el sitio de unión hidrofóbico de la proteína, y liberarse cuando el complejo llega a una nueva membrana, como la de las mitocondrias. Las mitocondrias sintetizan fosfatidilserina a partir de fosfatidiletanolamina, y además catalizan la síntesis del fosfolípido poco frecuente **cardiolipina**, que contiene cuatro cadenas de ácidos grasos (Fig. 11.9).

Mecanismo de la fosforilación oxidativa

La mayor parte de la energía utilizable obtenida de la degradación de los hidratos de carbono o de las grasas deriva de la fosforilación oxidativa que tiene lugar en el interior de la mitocondria. Por ejemplo, la degradación de

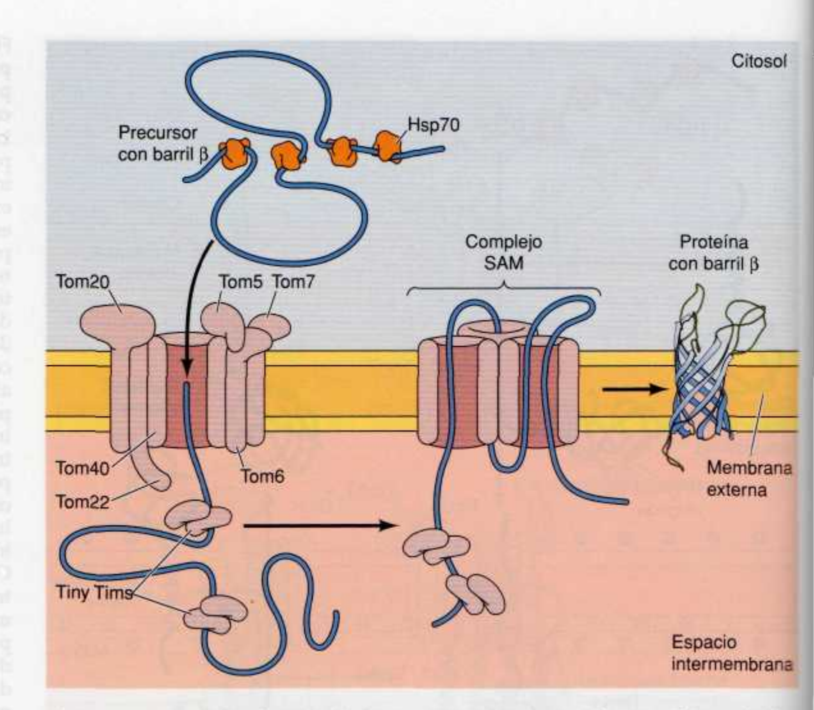


Figura 11.8 Inserción de proteínas con barril β en la membrana mitocondrial externa. La transferencia de los precursores de las proteínas con barril β de la membrana mitocondrial externa se efectúa a través del complejo Tom; estas proteínas se unen por acción de las proteínas chaperonas Tiny Tim en el espacio intermembrana. A continuación, se dirigen a un segundo translocón, conocido como SAM (maquinaria de distribución y ensamblaje), y se insertan en la membrana externa.

la glucosa mediante la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico rinde un total de cuatro moléculas de ATP, diez moléculas de NADH, y dos moléculas de $FADH_2$ (véase Cap. 3). Los electrones del NADH y del $FADH_2$ son transferidos después al oxígeno molecular, lo cual está acoplado a la formación de 32 a 34 moléculas adicionales de ATP mediante la fosforilación oxidativa. El transporte de electrones y la fosforilación oxidativa son actividades críticas de los complejos de las proteínas de la membrana mitocondrial interna, que puede considerarse como la fuente principal de energía celular.

Figura 11.9 Estructura de la cardiolipina. La cardiolipina es un fosfolípido «doble» poco frecuente, que se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial interna.

Cadena de transporte de electrones

Durante la **fosforilación oxidativa** los electrones derivados del NADH y $FADH_2$ se combinan con el O_2, y la energía liberada de estas reacciones de oxidación/reducción es utilizada para dirigir la síntesis de ATP a partir del ADP. La transferencia de electrones desde el NADH al O_2 es una reacción que desprende mucha energía, con una $\Delta G^{\circ\prime} = -52{,}5$ kcal/mol por cada par de electrones transferidos. Para poderse utilizar, esta energía debe producirse gradualmente, mediante el paso de los electrones a través de una serie de transportadores que constituyen la **cadena de transporte de electrones**. Estos transportadores están organizados en cuatro complejos en la membrana mitocondrial interna. Un quinto complejo de proteínas sirve después para acoplar las reacciones del transporte de electrones, productoras de energía, a la síntesis de ATP.

Los electrones del NADH entran en la cadena de transporte de electrones en el complejo I, constituido aproximadamente por 40 cadenas polipeptídicas (Fig. 11.10). Estos electrones primero se transfieren desde el NADH a un mononucleótido de flavina, y después, a través de un transportador de hierro-azufre, a la coenzima Q —un proceso que desprende energía con una $\Delta G^{\circ\prime} = -16{,}6$ kcal/mol—. La **coenzima Q** (también denominada **ubiquinona**) es una molécula pequeña, liposoluble, que transporta los electrones desde el complejo I, a través de la membrana, hasta el complejo III, que está constituido aproximadamente por 10 polipéptidos. En el complejo III los electrones se transfieren desde el citocromo *b* al citocromo *c* —una reacción que libera energía con una $\Delta G^{\circ\prime} = -10{,}1$ kcal/mol—. El **citocromo *c***, una proteína de membrana periférica, unida a la cara externa de la membrana interna, transporta a continuación los electrones al complejo IV (**citocromo oxidasa**), donde finalmente son transferidos al O_2 ($\Delta G^{\circ\prime} = -25{,}8$ kcal/mol).

Un complejo de proteínas diferente (complejo II), constituido por cuatro polipéptidos, recibe los electrones del succinato, que es un producto intermediario del ciclo del ácido cítrico (Fig. 11.11). Estos electrones son transferidos al $FADH_2$, en lugar de al NADH, y después a la coenzima Q. Desde la coenzima Q los electrones se transfieren al complejo III y después al complejo IV, como ya se ha descrito. A diferencia de la transferencia de electrones desde el NADH a la coenzima Q en el complejo I, la transferencia de electrones desde el $FADH_2$ a la coenzima Q no lleva asociada una disminución significativa de la energía libre, por lo que no está acoplada a la síntesis de ATP. Por tanto, el paso de los electrones derivados del $FADH_2$ a través de la cadena de transporte de electrones sólo rinde energía libre en los complejos III y IV.

La energía libre derivada del paso de electrones a través de los complejos I, III y IV se obtiene al acoplarse con la síntesis de ATP. Es importante destacar que el mecanismo por el que la energía derivada de estas reacciones de transporte de electrones se acopla a la síntesis de ATP, es fundamentalmente diferente de la síntesis de ATP durante la glicólisis o el ciclo del ácido cítrico. En estos últimos, un fosfato rico en energía se transfiere directamente al ADP desde otro sustrato, en una reacción que libera energía. Por ejemplo, en la reacción final de la glicólisis, el fosfato rico en energía del fosfoenolpiruvato es transferido al ADP, dando lugar a piruvato más ATP (véase Fig. 3.11). Esta transferencia directa de grupos fosfato de alta energía no tiene lugar durante el transporte de electrones. En su lugar, la energía derivada del transporte de electrones está acoplada a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La energía potencial almacenada en este gradiente se obtiene mediante un quinto complejo proteínico que acopla el flujo, energéticamente favorable, de los protones a través de la membrana, a la síntesis de ATP.

■ **La rotenona, un inhibidor de la transferencia electrónica desde el complejo I hasta la coenzima Q, se emplea como un insecticida de amplio espectro.**

■ **Adicionalmente a su papel en el transporte electrónico, el citocromo c es un regulador clave en la muerte celular programada en las células de mamífero (analizado en el Cap. 17).**

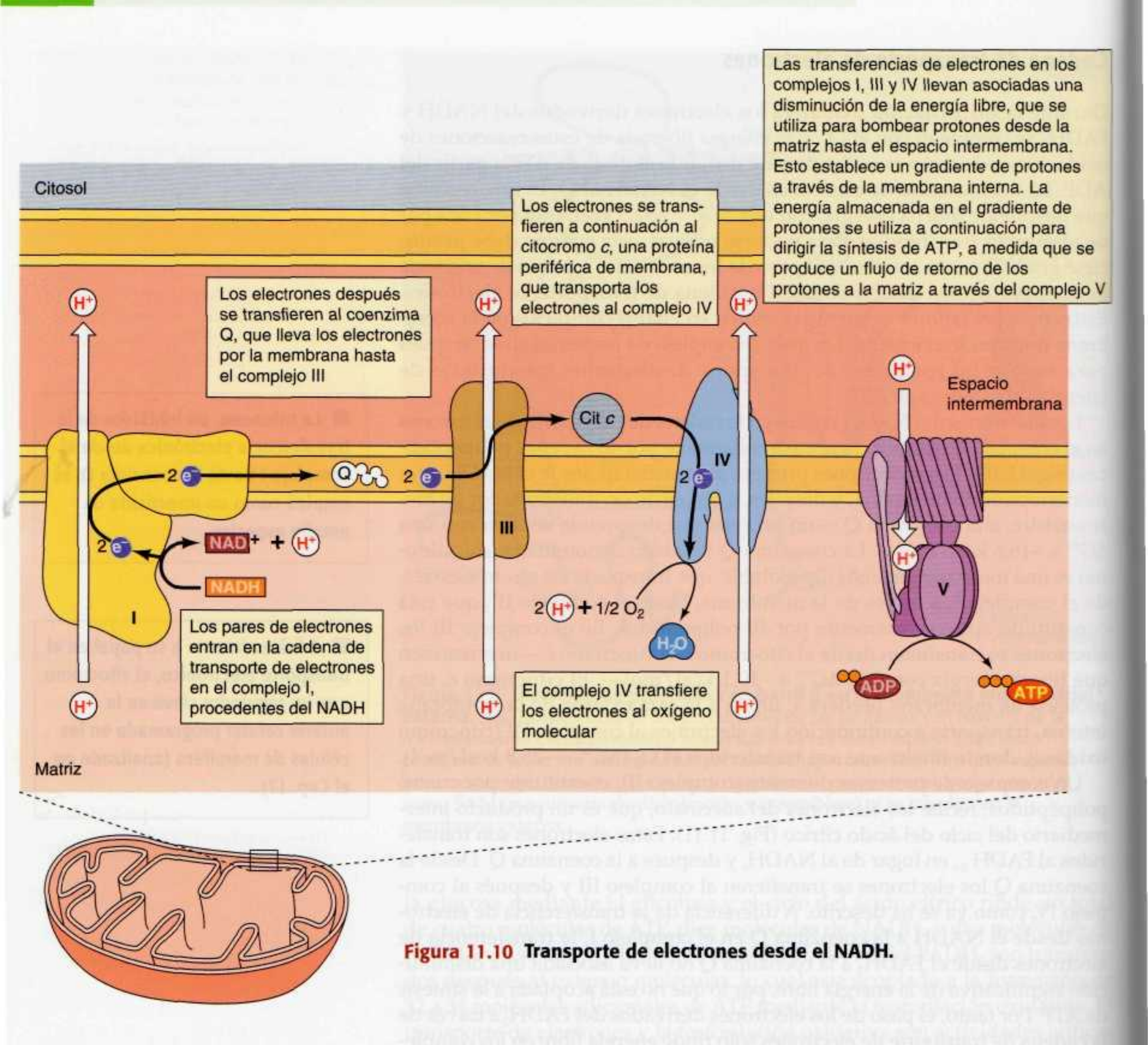


Figura 11.10 Transporte de electrones desde el NADH.

Acoplamiento quimiosmótico

El mecanismo de acoplamiento del transporte de electrones a la generación de ATP, el **acoplamiento quimiosmótico**, es un ejemplo significativo de la relación entre estructura y función en la biología celular. La hipótesis del acoplamiento quimiosmótico fue propuesta por primera vez en 1961 por Peter Mitchell, quien sugirió que el ATP se genera utilizando la energía almacenada en forma de un gradiente de protones a través de las membranas biológicas, en lugar de por una transferencia química directa de grupos ricos en energía. Inicialmente, los bioquímicos fueron muy escépticos con este planteamiento, y la hipótesis quimiosmótica tardó más de una década en ganar la aceptación general de la comunidad científica. Sin embargo, con el tiempo se acumuló una evidencia abrumadora a su favor, y actualmente el acoplamiento quimiosmótico se reconoce como un mecanismo general de generación de ATP, que interviene no sólo en las mitocondrias sino también en los cloroplastos y en las bacterias, donde se genera ATP mediante un gradiente de protones a través de la membrana plasmática.

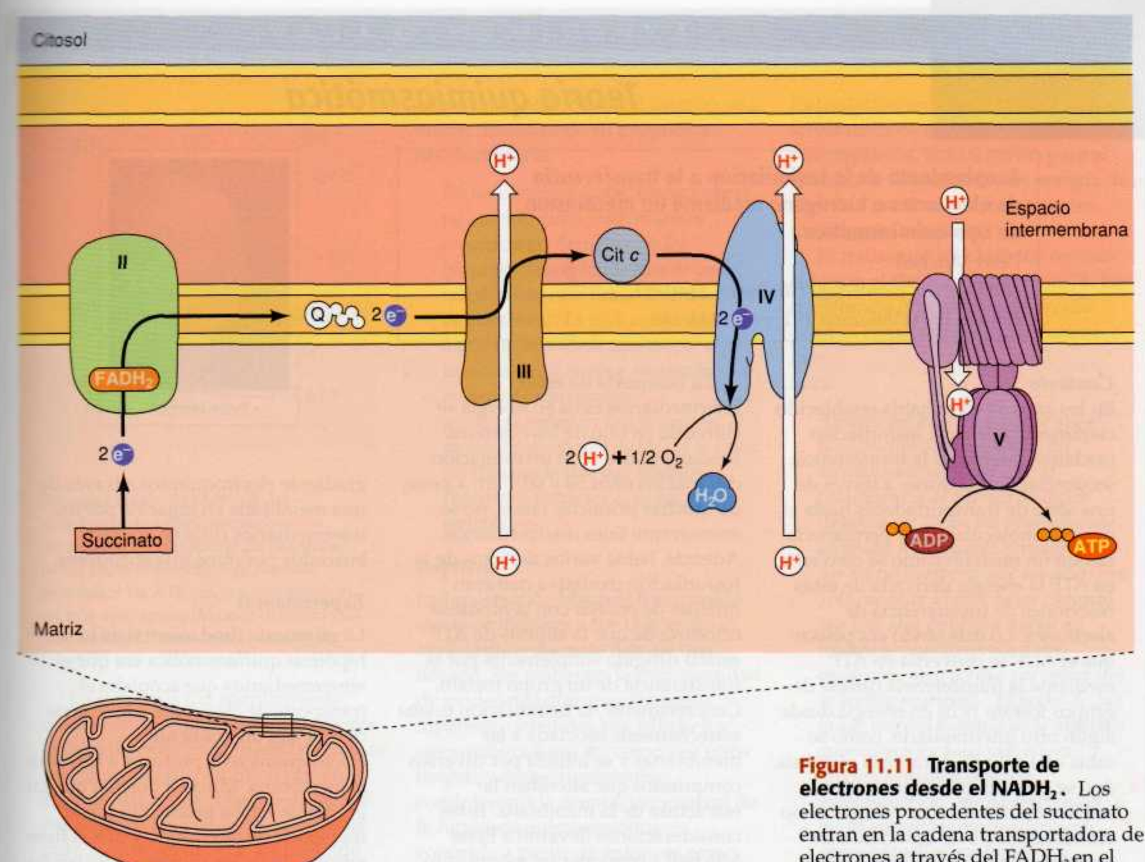


Figura 11.11 Transporte de electrones desde el NADH$_2$. Los electrones procedentes del succinato entran en la cadena transportadora de electrones a través del $FADH_2$ en el complejo II. A continuación son transferidos al coenzima Q y transportados a lo largo del resto de la cadena transportadora de electrones como se describió en la Figura 11.10. La transferencia de electrones desde el $FADH_2$ a la coenzima Q no lleva asociada una disminución significativa de la energía libre, por lo que en el complejo II no se bombean protones a través de la membrana.

El transporte de electrones a través de los complejos I, III y IV está acoplado al transporte de *protones fuera del interior de la mitocondria* (véase Fig. 11.9). Por tanto, las reacciones del transporte de electrones que liberan energía están acopladas a la transferencia de protones desde la matriz al espacio intermembrana, lo que establece un gradiente de protones a través de la membrana interna. Los complejos I y IV parece que actúan como bombas de protones, que tranfieren protones a través de la membrana como consecuencia de cambios conformacionales inducidos por el transporte de electrones. En el complejo III, los protones son transportados a través de la membrana mediante la coenzima Q, que acepta protones de la matriz en los complejos I y II y los libera en el espacio intermembrana en el complejo III. Los complejos I y III transfieren cuatro protones cada uno a través de la membrana por cada par de electrones. En el complejo IV, por cada par de electrones se bombean dos protones a través de la membrana y otros dos protones se combinan con el O_2 para formar H_2O en la matriz. Así, en cada uno de estos tres complejos, se transporta fuera de la matriz mitocondrial el equivalente de cuatro protones por cada par de electrones. Esta transferencia de protones desde la matriz al espacio intermembrana desempeña el papel fundamental de convertir la energía derivada de las reacciones de oxidación/reducción del transporte de electrones en la energía potencial almacenada en un gradiente de protones.



EXPERIMENTO CLAVE

Teoría quimiosmótica

Acoplamiento de la fosforilación a la transferencia de electrones e hidrógeno mediante un mecanismo de tipo quimiosmótico

Peter Mitchell
University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland
Nature, 1961, Volumen 191, págs. 144-148



Peter Mitchell

Contexto

En los años 50 ya se había establecido claramente que en la fosforilación oxidativa intervenía la transferencia secuencial de electrones a través de una serie de transportadores hasta el oxígeno molecular. Pero permanecía siendo un misterio cómo se convertía en ATP la energía derivada de estas reacciones de transferencia de electrones. Lo más obvio era pensar que el ADP se convertía en ATP mediante la transferencia directa de grupos fosfato ricos en energía desde algún otro intermediario, como se sabía que ocurría durante la glicólisis. Así, se postuló que se producían intermediarios ricos en energía como consecuencia de las reacciones de transferencia de electrones, y que estos intermediarios posteriormente dirigían la síntesis de ATP mediante la transferencia del grupo fosfato.

La búsqueda de estos intermediarios ricos en energía se convirtió en uno de los objetivos fundamentales de la investigación durante los años 50 y 60. Pero a pesar de muchas primicias falsas, no se encontraron tales intermediarios. Además, había varios aspectos de la fosforilación oxidativa que eran difíciles de encajar con la hipótesis ortodoxa de que la síntesis de ATP estaba dirigida simplemente por la transferencia de un grupo fosfato. Concretamente, la fosforilación estaba estrechamente asociada a las membranas y se inhibía por diversos compuestos que alteraban la estructura de la membrana. Estas consideraciones llevaron a Peter Mitchell a proponer un mecanismo fundamentalmente diferente de acoplamiento energético, en el que la síntesis de ATP estaba dirigida por un gradiente electroquímico a través de una membrana en lugar de por los intermediarios ricos en energía buscados por otros investigadores.

Experimentos

La propuesta fundamental de la hipótesis quimiosmótica era que el «intermediario» que acoplaba el transporte de electrones a la síntesis de ATP era un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. Mitchell postuló que tal gradiente estaba producido por el transporte de electrones, y que el flujo retrógrado de los protones a través de la membrana en la dirección energéticamente favorable se acoplaba a la síntesis de ATP (véase figura).

Debido a que los protones son partículas cargadas eléctricamente, la energía potencial almacenada en el gradiente de protones es de naturaleza tanto eléctrica como química. El componente eléctrico corresponde a la diferencia de voltaje a través de la membrana mitocondrial interna, siendo la matriz de la mitocondria negativa y el espacio intermembrana positivo. La energía libre correspondiente viene dada por la ecuación

$$\Delta G = -F\Delta V$$

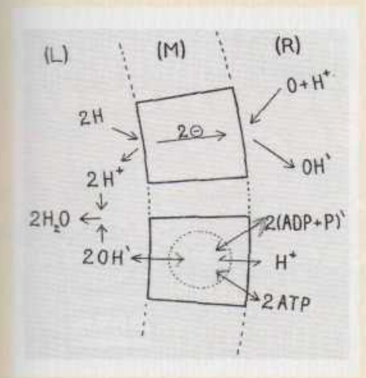
donde F es la constante de Faraday y ΔV es el potencial de membrana. La energía libre adicional que corresponde a la diferencia en la concentración de protones a través de la membrana, viene dada por la ecuación:

$$\Delta G = RT \ln \frac{[H^+]_i}{[H^+]_o}$$

donde $[H^+]_i$ y $[H^+]_o$ se refieren a la concentración de protones dentro y fuera de la mitocondria, respectivamente.

En las células metabólicamente activas, los protones son bombeados fuera de la matriz de tal manera que el gradiente de protones a través de la

EXPERIMENTO CLAVE



Representación de Mitchell del acoplamiento quimiosmótico entre un sistema de transporte de electrones (en la parte superior) y un sistema generador de ATP (en la parte inferior) en una membrana (M) que delimita una fase acuosa L en un medio acuoso R.

La hipótesis del acoplamiento quimiosmótico explicaba claramente la falta de éxito en la identificación de un intermediario químico rico en energía, así como el hecho de que se necesitaran las membranas intactas para la síntesis de ATP. Es más, fue un concepto radical que se enfrentó al dogma bioquímico de la época. En uno de los últimos párrafos del artículo de 1961, Mitchell asumió una visión filosófica de su propuesta revolucionaria:

En las ciencias exactas, causa y efecto no son más que acontecimientos secuenciales. Actualmente los bioquímicos aceptan la idea de que el metabolismo es la causa del transporte de membrana. La tesis subyacente a la hipótesis formulada aquí es que si los procesos que llamamos metabolismo y transporte representan acontecimientos en una secuencia, el metabolismo no sólo puede ser la causa del transporte sino que también el transporte puede ser la causa del metabolismo.

Impacto

La hipótesis de Mitchell fue acogida con escepticismo y fue objeto de un agrio debate durante más de una década. Sin embargo, la gran cantidad de evidencias que apoyaban esta hipótesis, obtenidas por Mitchell y sus colaboradores así como por otros investigadores, finalmente condujeron a la aceptación general de la hipótesis quimiosmótica —conocida a partir de entonces como teoría quimiosmótica—. Ahora es aceptada no sólo como la base para la generación de ATP durante la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, sino también para el transporte dependiente de energía de diversas moléculas a través de las membranas celulares.

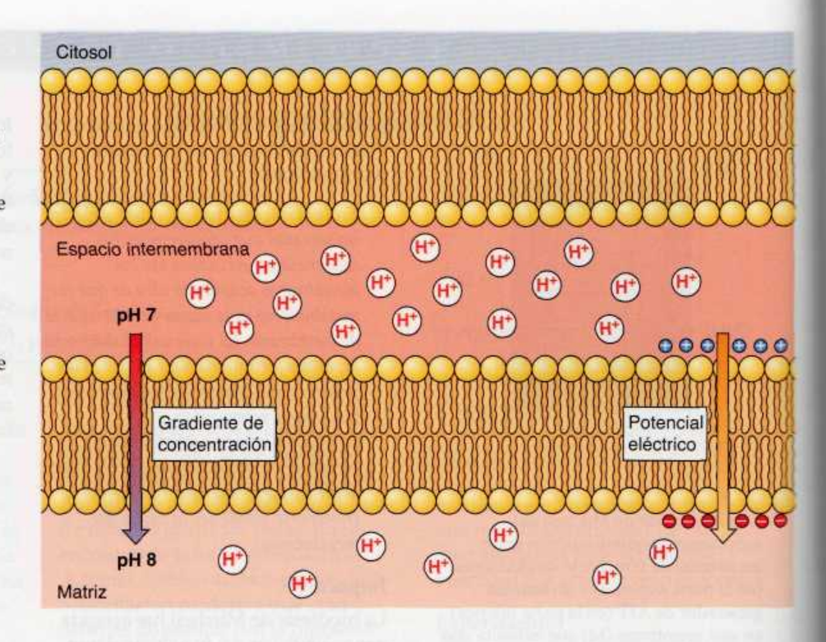
El trabajo de Mitchell fue reconocido con el Premio Nobel en 1978. La conferencia que pronunció en esa ocasión comenzaba de la siguiente manera:

Aunque me hubiera gustado que el fundamento quimiosmótico del metabolismo vectorial y de la transferencia de energía biológica llegara a ser algún día generalmente aceptado, hubiera sido presuntuoso por mi parte esperar que eso ocurriera. ¿No fue Max Planck quien comentó que una idea científica nueva no triunfa porque convence a sus oponentes, sino porque sus oponentes se acaban muriendo? El hecho de que lo que empezó llamándose la hipótesis quimiosmótica haya sido ahora proclamado como la teoría quimiosmótica... me ha sorprendido y me ha encantado, particularmente porque aquéllos que fueron anteriormente mis oponentes más competentes aún están en la etapa más importante de sus vidas científicas.

membrana interna corresponde aproximadamente a una unidad de pH, o a una concentración de protones en el interior de la mitocondria diez veces menor (Fig. 11.12). Por tanto, el pH de la matriz mitocondrial es aproximadamente 8, comparado con el pH neutro (aproximadamente 7) del citosol y del espacio intermembrana. Este gradiente también genera un potencial eléctrico de aproximadamente 0,14 V a través de la membrana, siendo la matriz negativa. Tanto el gradiente de pH como el potencial eléctrico dirigen el flujo de protones desde el citosol de vuelta a la matriz, por lo que su combinación supone un **gradiente electroquímico** a través de la membrana mitocondrial interna, con una ΔG correspondiente de alrededor de -5 kcal/mol por protón.

Debido a que la bicapa fosfolipídica es impermeable a los iones, los protones sólo pueden atravesar la membrana a través de un canal de proteínas. Esta restricción permite aprovechar la energía del gradiente electroquímico y que sea convertida en ATP, mediante la acción del quinto complejo que interviene en la fosforilación oxidativa, el complejo V, o **ATP sintetasa** (véase Fig. 11.10). La ATP sintetasa está constituida por dos componentes estructuralmente diferentes, F_0 y F_1, que están unidos por un tallo estrecho (Fig. 11.13). La porción F_0 es un motor de energía eléctrica que atraviesa la membrana in-

Figura 11.12 Naturaleza electroquímica del gradiente de protones. Debido a que los protones están cargados positivamente, el gradiente de protones que se establece a través de la membrana mitocondrial interna tiene un componente tanto químico como eléctrico. El componente químico es el gradiente de la concentración de protones, o de pH, que se corresponde con una concentración de protones aproximadamente diez veces superior en el lado citosólico de la membrana mitocondrial interna (una diferencia de una unidad de pH). Además, hay un potencial eléctrico a través de la membrana, debido al incremento neto de la carga positiva en el lado citoplásmico.



■ **Otro ejemplo de un motor rotacional electroquímico es el flagelo bacteriano.**

terna y proporciona un canal a través del cual los protones fluyen de vuelta desde el espacio intermembrana a la matriz. El retorno energéticamente favorable de los protones a la matriz está acoplado con la síntesis de ATP mediante la subunidad F_1, que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP e iones fosfato (P_i). Estudios estructurales detallados han establecido el mecanismo de acción de la ATP sintetasa, que implica el acoplamiento mecánico entre las subunidades F_0 y F_1. Concretamente, el flujo de protones a través de F_0 determina la rotación de F_1, que actúa como un motor de rotación que dirige la síntesis de ATP.

Parece que se requiere el flujo de vuelta a través de la membrana de cuatro protones a través de F_0 para dirigir la síntesis de una molécula de ATP por F_1, lo que concuerda con que cada una de las transferencias de protones en los complejos I, III y IV, contribuye con la suficiente energía libre al gradiente de protones como para dirigir la síntesis de una molécula de ATP. De esta manera, la oxidación de una molécula de NADH da lugar a la síntesis de tres moléculas de ATP, mientras que la oxidación de $FADH_2$, que entra en la cadena de transporte de electrones en el complejo II, genera sólo dos moléculas de ATP.

Transporte de metabolitos a través de la membrana interna

Además de dirigir la síntesis de ATP, la energía potencial almacenada en el gradiente electroquímico dirige el transporte de moléculas pequeñas dentro y fuera de la mitocondria. Por ejemplo, el ATP sintetizado en las mitocon-

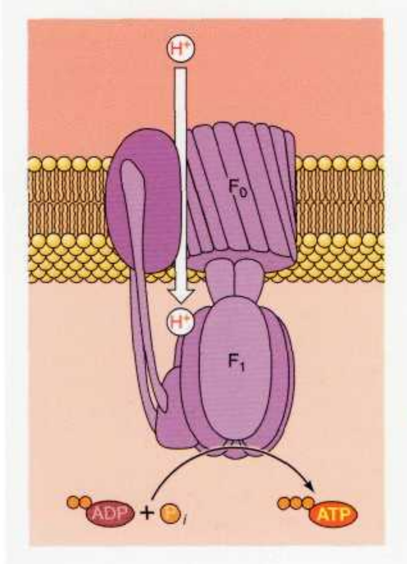


Figura 11.13 Estructura de la ATP sintetasa. La ATP sintetasa mitocondrial (complejo V) está constituida por dos subunidades, F_0 y F_1, que están unidas por un tallo estrecho. F_0 atraviesa la bicapa lipídica, formando un canal a través del cual los protones pueden atravesar la membrana. F_1 aprovecha la energía libre derivada del flujo de protones a favor del gradiente electroquímico, catalizando la síntesis de ATP.

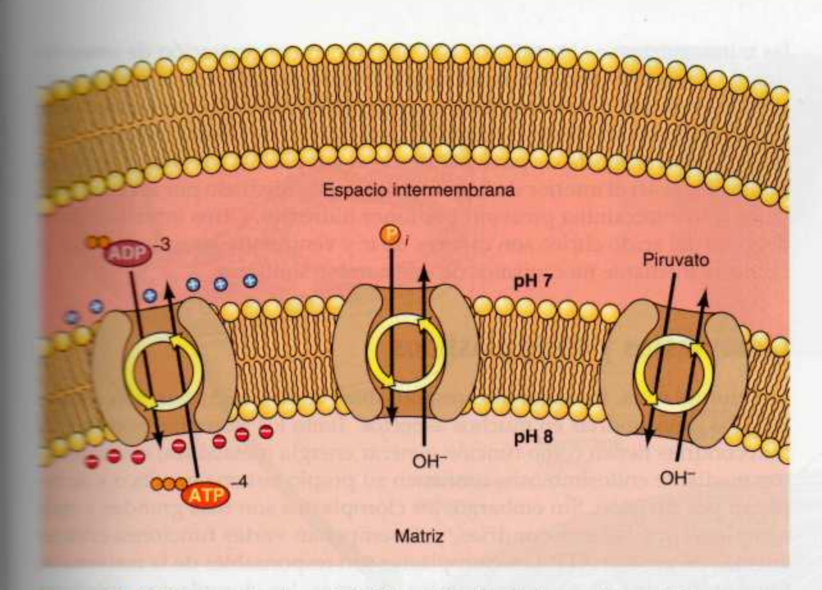


Figura 11.14 Transporte de metabolitos a través de la membrana interna mitocondrial. El transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana interna mitocondrial está mediado por proteínas transportadoras que atraviesan la membrana y está dirigido por el gradiente electroquímico. Por ejemplo, el ATP es exportado desde las mitocondrias al citosol mediante un transportador que lo intercambia por ADP. El componente eléctrico del gradiente electroquímico dirige este intercambio: el ATP tiene una mayor carga negativa (–4) que el ADP (–3), por lo que el ATP es exportado desde la matriz mitocondrial al citosol mientras que el ADP es importado a lamitocondria. Por el contrario, el transporte de fosfato (P_i) y de piruvato está acoplado a un intercambio de iones hidroxilo (OH^-); en este caso el componente de pH del gradiente electroquímico dirige la exportación de iones hidroxilo, acoplada al transporte de P_i y piruvato al interior de las mitocondrias.

drias tiene que ser exportado al citosol, mientras que el ADP y el P_i tienen que ser importados desde el citoplasma para que continúe la síntesis de ATP. El gradiente electroquímico generado por el bombeo de protones proporciona la energía requerida para el transporte de estas moléculas y de otros metabolitos que se necesitan en las mitocondrias (Fig. 11.14).

El transporte de ATP y ADP a través de la membrana interna está mediado por una proteína integral de membrana, el transportador de nucleótidos de adenina, que transporta una molécula de ADP al interior de la mitocondria a cambio de una molécula de ATP transferida desde la mitocondria al citosol. Debido a que el ATP tiene una carga negativa mayor que el ADP (–4 en comparación con –3), este intercambio está dirigido por el componente eléctrico del gradiente electroquímico. Puesto que el gradiente de protones establece una carga positiva en el lado citosólico de la membrana, el intercambio de ATP por ADP es energéticamente favorable.

Además de ADP, la síntesis de ATP en la mitocondria también requiere iones fosfato (P_i), por lo que también debe importarse P_i desde el citoplasma. Esto lo realiza otra proteína transportadora de membrana, que importa fosfato ($H_2PO_4^-$) y exporta iones hidroxilo (OH^-). Este intercambio es eléctricamente neutro porque tanto los iones fosfato como los iones hidroxilo tienen una carga de –1. Sin embargo, el intercambio está dirigido por el gradiente de la concentración de protones; el pH más elevado en el interior de

■ Todos los mamíferos recién nacidos (y determinados mamíferos adultos) contienen un tejido especializado denominado grasa parda. Las mitocondrias de las células de la grasa parda contienen una proteína desacopladora denominada termogenina, que emplea el gradiente de protones para generar calor. La grasa parda es muy importante para la termorregulación en neonatos y en animales que hibernan.

las mitocondrias se corresponde con una mayor concentración de iones hidroxilo, lo que favorece su translocación al lado citosólico de la membrana.

La energía del gradiente electroquímico se utiliza de forma similar para dirigir el transporte de otros metabolitos al interior de las mitocondrias. Por ejemplo, el transporte de piruvato desde el citoplasma (donde se produce por la glicólisis) al interior de la mitocondria está mediado por un transportador que intercambia piruvato por iones hidroxilo. Otros intermediarios del ciclo del ácido cítrico son capaces de ir y venir entre las mitocondrias y el citosol mediante mecanismos de intercambio similares.

Cloroplastos y otros plástidos

Los **cloroplastos**, los orgánulos responsables de la fotosíntesis, son similares a las mitocondrias en muchos aspectos. Tanto los cloroplastos como las mitocondrias tienen como función generar energía metabólica, evolucionaron mediante endosimbiosis, contienen su propio sistema genético y se replican por división. Sin embargo, los cloroplastos son más grandes y más complejos que las mitocondrias, y desempeñan varias funciones críticas además de generar ATP. Los cloroplastos son responsables de la conversión fotosintética de CO_2 en carbohidratos. Además, los cloroplastos sintetizan aminoácidos, ácidos grasos y los componentes lipídicos de sus propias membranas. En los cloroplastos también tiene lugar la reducción de nitrito (NO_2^-) a amoniaco (NH_3), una etapa esencial en la incorporación de nitrógeno a los compuestos orgánicos. Es más, los cloroplastos son sólo uno de los diferentes tipos de orgánulos relacionados (plástidos) que desempeñan diversos papeles en las células vegetales.

Estructura y función de los cloroplastos

Los cloroplastos de las plantas son orgánulos grandes (5 a 10 µm de longitud) que, como las mitocondrias, están delimitados por una doble membrana denominada la envuelta del cloroplasto (Fig. 11.15). Además de las membranas interna y externa de la envuelta, los cloroplastos tienen un tercer sistema de membranas interno, denominado la membrana del tilacoide. La **membrana del tilacoide** forma una red de discos aplanados denominados tilacoides, que suelen estar organizados en apilamientos denominados *grana*. Debido a esta estructura de membrana triple, la organización interna de los cloroplastos es más compleja que la de las mitocondrias. Concretamente, sus tres membranas dividen a los cloroplastos en tres compartimentos internos diferentes: 1) el espacio intermembrana entre las dos membranas de la envoltura del cloroplasto; 2) el **estroma**, que se dispone dentro de la envuelta pero por fuera de la membrana del tilacoide, y 3) la luz del tilacoide.

A pesar de su mayor complejidad, las membranas de los cloroplastos tienen similitudes funcionales claras con las de las mitocondrias —como era de esperar, dado el papel de ambos orgánulos en la generación quimiosmótica de ATP—. La membrana externa de la envuelta del cloroplasto, como la de la mitocondria, contiene porinas y por tanto es permeable a las moléculas pequeñas. Por el contrario, la membrana interna es impermeable a iones y a metabolitos, que sólo podrán entrar en los cloroplastos a través de transportadores específicos de membrana. Estas propiedades de las membranas interna y externa de la envuelta del cloroplasto son similares a las de las membranas interna y externa de las mitocondrias: en ambos casos la membrana interna restringe el paso de moléculas entre el citosol y el interior del orgánulo. El estroma del cloroplasto también equivale funcionalmente a la matriz mitocondrial: contiene el sistema genético del cloroplasto y diversas

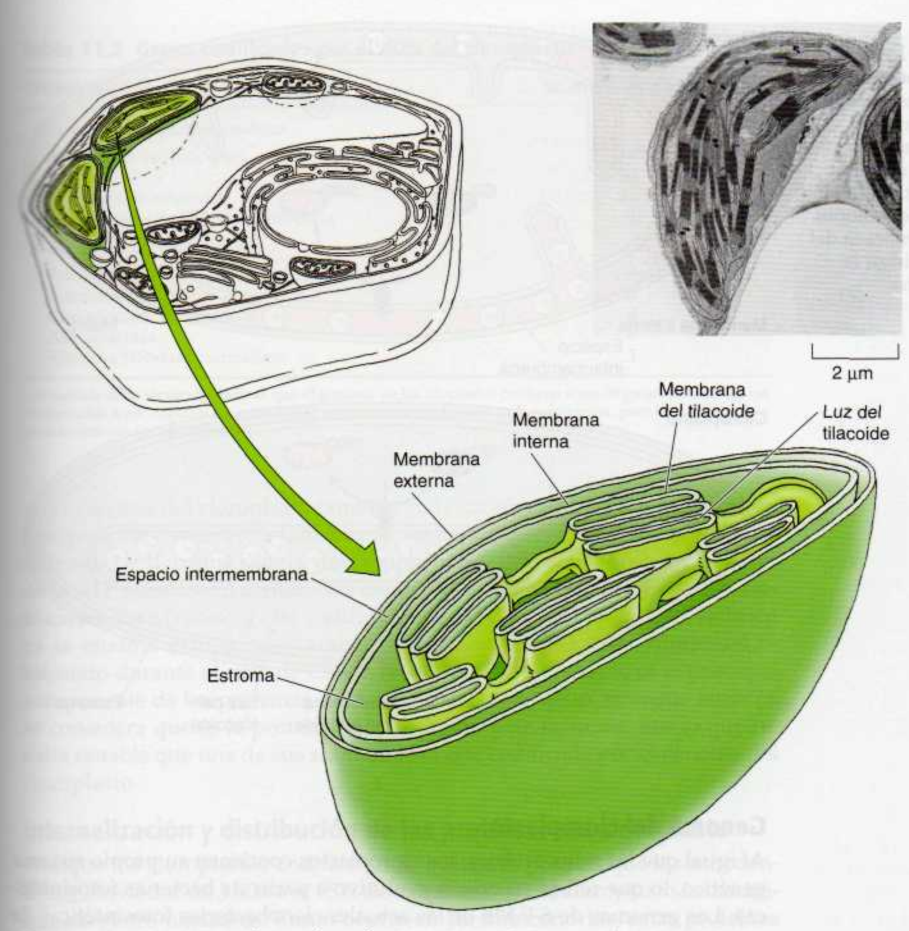
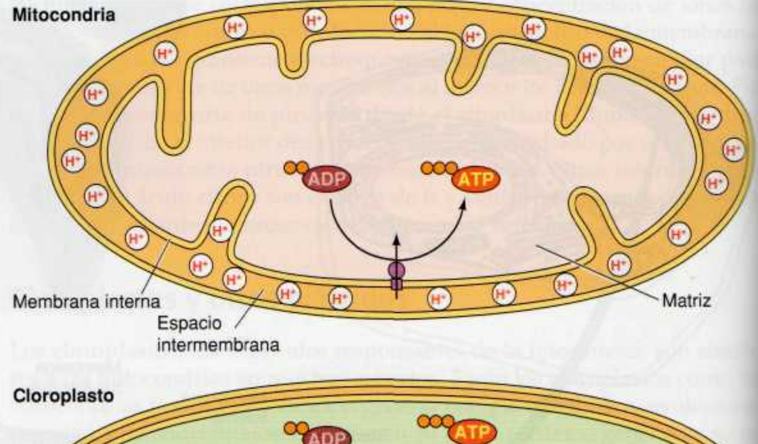


Figura 11.15 Estructura de un cloroplasto. Además de las membranas interna y externa de la envuelta, los cloroplastos contienen un tercer sistema de membranas internas: la membrana del tilacoide. Estas membranas dividen a los cloroplastos en tres compartimentos internos. (Microfotografía electrónica por E. H. Newcombe/Biological Photo Service.)

enzimas metabólicas, incluyendo las responsables de la conversión crítica de CO_2 en carbohidratos durante la fotosíntesis.

La principal diferencia entre los cloroplastos y las mitocondrias, tanto en términos de estructura como de función, es la membrana del tilacoide. Esta membrana tiene una importancia fundamental en los cloroplastos, donde realiza el papel de la membrana mitocondrial interna en el transporte de electrones y en la generación quimiosmótica de ATP (Fig. 11.16). La membrana interna de la envuelta del cloroplasto (que no está plegada en crestas) no funciona en el transporte electrónico ni en la fotosíntesis. En su lugar, el sistema de transporte de electrones del cloroplasto se localiza en la membrana del tilacoide, y los protones son bombeados a través de esta membrana desde el estroma hacia la luz del tilacoide. El gradiente electroquímico resultante dirige la síntesis de ATP a medida que los protones retornan hacia el estroma. Por tanto, en cuanto a su papel en la generación de energía metabólica, la membrana del tilacoide de los cloroplastos equivale a la membrana interna de las mitocondrias.



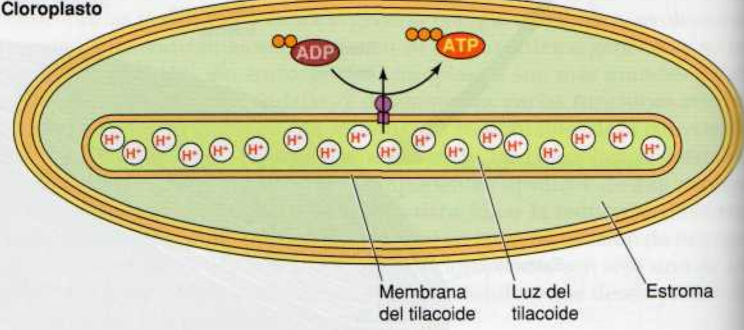


Figura 11.16 Generación quimiosmótica de ATP en los cloroplastos y en las mitocondrias. En las mitocondrias, el transporte de electrones genera un gradiente de protones a través de la membrana interna, que se utiliza para dirigir la síntesis de ATP en la matriz. En los cloroplastos, el gradiente de protones se genera a través de la membrana del tilacoide y se utiliza para dirigir la síntesis de ATP en el estroma.

Genoma del cloroplasto

Al igual que las mitocondrias, los cloroplastos contienen su propio sistema genético, lo que refleja su origen evolutivo a partir de bacterias fotosintéticas. Los genomas de 6-9 Mb de las actuales cianobacterias fotosintéticas de vida libre codifican entre 5.400 y 7.200 proteínas. Al igual que en las mitocondrias, los genomas de los cloroplastos consisten en moléculas de ADN circular presentes en múltiples copias en cada orgánulo. Sin embargo, el genoma de los cloroplastos es más grande y más complejo que el de las mitocondrias, oscilando entre 120 y 160 kb y con un contenido aproximado de 150 genes.

Se ha secuenciado el genoma de los cloroplastos de varias plantas, lo que ha permitido identificar muchos de los genes presentes en el ADN de este orgánulo. Estos genes codifican tanto ARN como proteínas que intervienen en la expresión génica, así como varias proteínas implicadas en la fotosíntesis (Tabla 11.2). Tanto los ARN ribosómicos como los de transferencia utilizados para la traducción de los ARNm del cloroplasto son codificados por el genoma del orgánulo. Estos incluyen cuatro ARNr (23S, 16S, 5S y 4,5S) y 30 especies de ARNt. A diferencia de lo que ocurría con el menor número de ARNt codificados por el genoma mitocondrial, los ARNt del cloroplasto son suficientes para que se traduzcan todos los codones del ARNm según el código genético universal. Además de estos componentes de ARN del sistema de traducción, el genoma del cloroplasto codifica alrededor de 20 proteínas ribosómicas, que representan aproximadamente un tercio de las proteínas de los ribosomas del cloroplasto. Algunas subunidades de la ARN polimerasa también son codificadas por los cloroplastos, aunque otros factores y subunidades adicionales de la ARN polimerasa necesarios para la expresión genética del cloroplasto se codifican en el núcleo.

Tabla 11.2 Genes codificados por el ADN del cloroplasto

Función	Número de genes
Genes para el aparato genético	
ARNr (23S, 16S, 5S, 4,5S)	4
ARNt	30
Proteínas ribosómicas	21
Subunidades de la ARN polimerasa	4
Genes para la fotosíntesis	
Fotosistema I	5
Fotosistema II	12
Complejo del citocromo *bf*	4
ATP sintetasa	6
Ribulosa bifosfato carboxilasa	1

Los análisis de la secuencia indican que el genoma de los croplastos contiene otros 30 genes además de los enumerados aquí. Algunos de estos codifican proteínas implicadas en la respiración, pero la mayoría permanecen sin ser identificados.

El genoma del cloroplasto también codifica aproximadamente 30 proteínas que intervienen en la fotosíntesis, incluyendo componentes de los fotosistemas I y II, componentes del complejo del citocromo *bf*, y componentes de la ATP sintetasa. Además, una de las subunidades de la ribulosa bifosfato carboxilasa (rubisco) está codificada por el ADN del cloroplasto. Rubisco es la enzima crítica que cataliza la adición de CO_2 a la ribulosa-1,5-bifosfato durante el ciclo de Calvin (véase Fig. 3.18). No sólo es el principal componente de las proteínas del estroma del cloroplasto, sino que también se considera que es la proteína más abundante de la Tierra, por lo que resulta notable que una de sus subunidades esté codificada por el genoma del cloroplasto.

Internalización y distribución de las proteínas del cloroplasto

Aunque los cloroplastos codifican más proteínas propias que las mitocondrias, alrededor de 3.500 o el 95% de las proteínas del cloroplasto las codifican los genes nucleares. Como ocurre en las mitocondrias, estas proteínas son sintetizadas en los ribosomas citosólicos y después pasan al interior del cloroplasto como cadenas polipeptídicas completas. A continuación han de distribuirse a su localización apropiada en el cloroplasto —una tarea más complicada incluso que la distribución de las proteínas en las mitocondrias, ya que los cloroplastos contienen tres membranas separadas que los divide en tres compartimentos internos distintos.

Las proteínas son dirigidas para entrar en los cloroplastos mediante unas secuencias *N*-terminales de 30 a 100 aminoácidos denominadas **péptidos de tránsito**, que dirigen el transporte de las proteínas a través de las dos membranas de la envoltura del cloroplasto, y que después son eliminadas mediante escisión proteolítica (Fig. 11.17). Un **complejo guía** reconoce inicialmente a los péptidos de tránsito y los dirige al translocasa del miembro externo del cloroplasto (el **complejo Toc**), donde se unen a los receptores Toc34 y Toc159. A diferencia de las presecuencias para la internalización mitocondrial, los péptidos de tránsito no están cargados positivamente y la membrana interna del cloroplasto no posee un fuerte potencial eléctrico. La internalización de cloroplastos requiere moléculas Hsp70 para mantener a la pre-proteína en su estado sin plegar. Además, las moléculas Hsp70 están unidas al complejo Toc donde dirigen la internalización de proteínas mediante la hidrólisis de ATP (véase Fig. 11.5). Al menos una proteína Toc, Toc34, une GTP, y la hidrólisis de GTP puede proporcionar una fuente adicional de energía para la translocación. Por otra parte, los cloroplastos cuentan con otro receptor diferente, Toc64, que funciona de manera muy similar

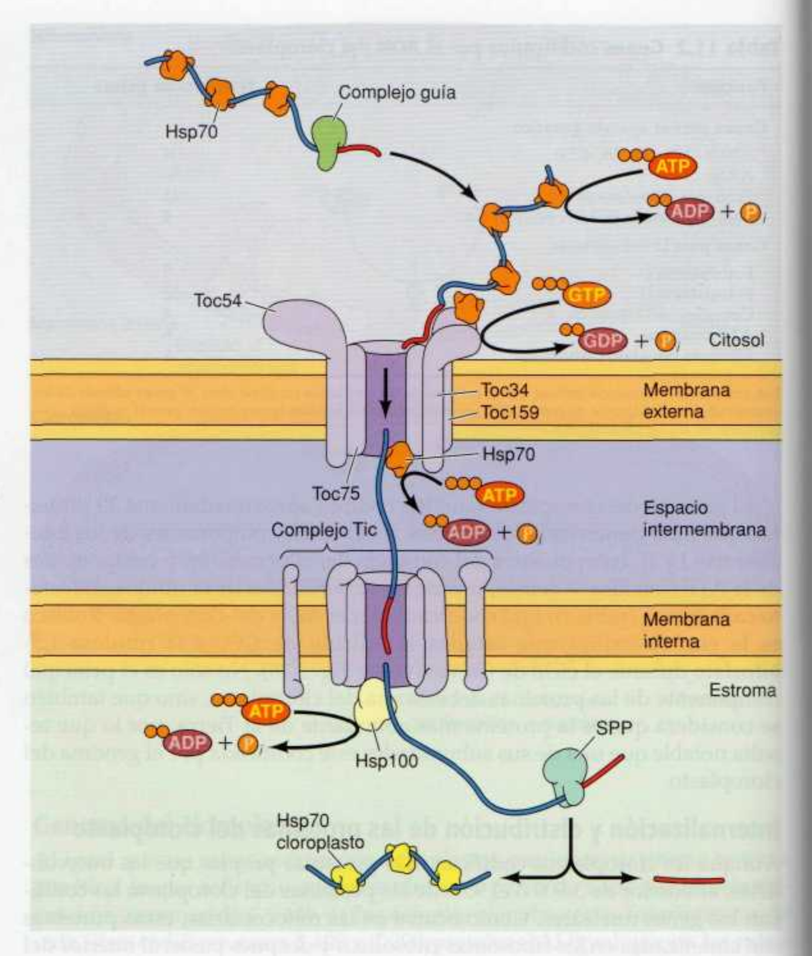


Figura 11.17 Internalización de proteínas al estroma del cloroplasto. Las proteínas con péptidos de tránsito N-terminales son reconocidas por un complejo guía que las dirige al complejo Toc, en la membrana externa del cloroplasto. El péptido de tránsito se une en primer lugar a Toc34 y Toc159, que se asocia con Hsp70, antes de pasar al poro de internalización Toc75. El paso a través de la membrana externa también requiere la hidrólisis de ATP por Hsp70 presente en el espacio intermembrana, y posiblemente la hidrólisis de GTP por parte de Toc34. Una vez que ha atravesado la membrana externa del cloroplasto, el péptido de tránsito pasa al complejo Tic en la membrana interna. La pre-proteína es arrastrada a través del complejo Tic por la acción de Hsp100. En el estroma, el péptido de tránsito es eliminado por la peptidasa procesadora estromal (SPP) del cloroplasto y la proteína interacciona con Hsp70.

al receptor Tom70 de las mitocondrias, ya que se une a preproteínas portadoras de una señal distinta de direccionamiento y las dirige hacia el translocón Toc75.

Una vez que se han transportado las pre-proteínas a través del complejo Toc, son transferidas al translocasa del cloroplasto de la membrana interna (el **complejo Tic**) y transportadas dentro del estroma. Al igual que los complejos Toc, Tom y Tim, Tic es un complejo multiproteína con uno o más canales proteicos. Sin embargo, no se conoce bien su composición proteica, quizás porque hay más de un tipo de complejo Tic. Una chaperona de la familia Hsp 100 (otra familia de chaperonas además de aquellas analizadas en el Cap. 8) está asociada con el lado estromal del complejo Tic. Esta Hsp100 del cloroplasto actúa para arrastrar a la pre-proteína a través de la membrana interna. En el estroma, el péptido de tránsito es escindido por una **peptidasa procesadora estromal (SPP: *stromal processing peptidase*)**, y la proteína se asocia con las chaperonas Hsp70 estromales. Al igual que en la matriz mitocondrial, algunas proteínas que permanecen en el estroma completan su plegamiento en el interior de una chaperonina Hsp60.

Se conoce poco sobre cómo las proteínas se dirigen a las membranas externa o interna del cloroplasto. Las proteínas que deben incorporarse en la luz del tilacoide se transportan a su destino en dos pasos. En primer lugar son internalizadas en el estroma, como se ha descrito previamente, y a con-

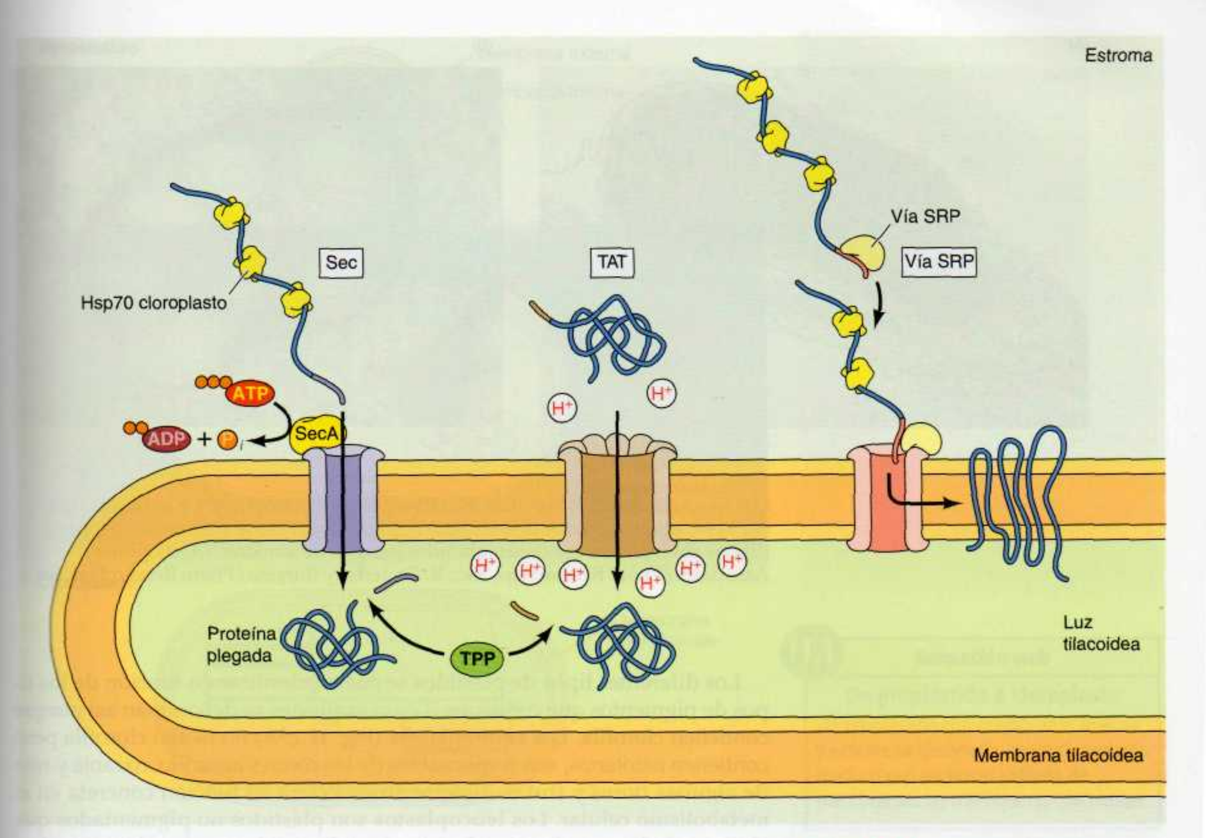


Figura 11.18 Importe de proteínas en la luz o membrana tilacoidea. Existen tres vías caracterizadas que transfieren proteínas desde el estroma a la luz o la membrana tilacoidea. En la vía Sec, la proteína SecA reconoce una secuencia señal tilacoidea y dirige la proteína al translocón Sec, empleando energía derivada de la hidrólisis de ATP para transferir la proteína a la luz. En la luz, la secuencia señal tilacoidea es escindida por una proteasa procesadora tilacoidea (TPP: *thylacoid processing protease*). En la vía de translocación de doble arginina (TAT: *twin-arginintranslocation*), una secuencia de transferencia tilacoidea escindible que contiene dos argininas cerca del extremo amino terminal, dirige la proteína completamente plegada directamente a un translocón nuevo, que las inserta en la luz tilacoidea. Tanto el ensamblaje del translocón y la translocación de la proteína son dependientes del gradiente de protones a través de la membrana tilacoidea. En la vía SRP, las proteínas transmembrana son reconocidas por la partícula de reconocimiento de la señal de cloroplasto (SRP), e insertadas en la membrana tilacoidea.

tinuación dirigidas para su translocación a través de la membrana del tilacoide por una segunda secuencia señal. Las proteínas se translocan a la luz del tilacoide mediante al menos tres vías diferentes (Fig. 11.18). En la vía Sec, la secuencia señal tilacoidea es reconocida por la proteína SecA y es translocada de forma dependiente de ATP a través del translocón Sec. La segunda vía (o TAT) emplea una secuencia señal de doble arginina y depende del gradiente de protones que exista a través de la membrana del tilacoide para translocar proteínas completamente plegadas. Una tercera vía (o SRP) se emplea para las proteínas de la membrana tilacoidea, que son reconocidas por una partícula de reconocimiento de la señal estromal (SRP: *stromal recognition particle*). Adicionalmente, algunas proteínas pueden insertarse directamente en la membrana tilacoidea.

Otros plástidos

Los cloroplastos son sólo uno de los miembros, aunque el más importante, de una familia más amplia de orgánulos vegetales denominados **plástidos**. Todos los plástidos contienen el mismo genoma que los cloroplastos, pero se diferencian tanto en la estructura como en la función. Los cloroplastos están especializados para la fotosíntesis y son únicos al contener el sistema interno de membranas del tilacoide. Otros plástidos, que intervienen en diversos aspectos del metabolismo de la célula vegetal (como la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos lípidos, hormonas vegetales, nucleótidos, vitaminas y metabolitos secundarios), están delimitados por las dos membranas de la envuelta del plástido pero carecen de las membranas del tilacoide y de otros componentes del aparato fotosintético.

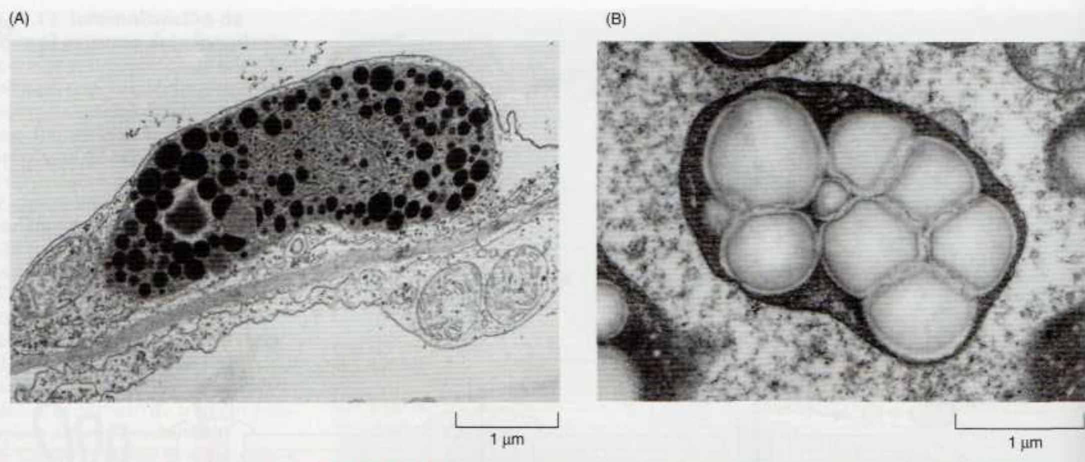


Figura 11.19 Microfotografías electrónicas de cromoplastos y amiloplastos. (A) Los cromoplastos contienen gotitas de lípidos donde se almacenan carotenos. (B) Los amiloplastos contienen gránulos grandes de almidón. (A, Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.; B. Dr. Jeremy Burgess/Photo Researchers, Inc.)

Los diferentes tipos de plástidos se suelen clasificar en función de los tipos de pigmentos que contienen. Los cloroplastos se denominan así porque contienen clorofila. Los **cromoplastos** (Fig. 11.19A) no tienen clorofila pero contienen carotenos; son responsables de los colores amarillo, naranja y rojo de algunas flores y frutas, aunque no está clara su función concreta en el metabolismo celular. Los **leucoplastos** son plástidos no pigmentados que almacenan diversas fuentes de energía en los tejidos no fotosintéticos. Los **amiloplastos** (Fig. 11.19B) y los **elaioplastos** son ejemplos de leucoplastos que almacenan almidón y lípidos, respectivamente.

Todos los plástidos, incluidos los cloroplastos, proceden de los **proplástidos**, orgánulos pequeños (0,5 µm a 1 µm de diámetro) e indiferenciados, presentes en las células en división de las raíces y brotes de las plantas. Los proplástidos posteriormente dan lugar a los diversos tipos de plástidos maduros, en función de las necesidades de las células diferenciadas. Además, los plástidos maduros son capaces de cambiar de un tipo a otro. Por ejemplo, los cromoplastos se desarrollan a partir de los cloroplastos durante la maduración de la fruta (p. ej., los tomates). Durante este proceso se descomponen la clorofila y la membrana del tilacoide, mientras que se sintetizan nuevos tipos de carotenos.

Una característica interesante de los plástidos es que su desarrollo está controlado por señales ambientales y por programas intrínsecos de diferenciación celular. Por ejemplo, en las células fotosintéticas de las hojas, los proplástidos dan lugar a los cloroplastos (Fig. 11.20). Durante este proceso la membrana del tilacoide se origina por gemación de vesículas a partir de la membrana interna de la envoltura del plástido, y se sintetizan y ensamblan los diferentes componentes del aparato fotosintético. Sin embargo, los cloroplastos sólo se desarrollan en presencia de luz. Si las plantas se mantienen en la oscuridad, el desarrollo de los proplástidos en las hojas se detiene en un estado intermedio (denominado **etioplasto**), en el que se ha formado una estructura semicristalina de membranas internas tubulares pero no se ha sintetizado clorofila (Fig. 11.21). Si las plantas que han crecido en la oscuridad se exponen posteriormente a la luz, los etioplastos continúan su desarrollo hasta cloroplastos. Hay que destacar que este doble control del

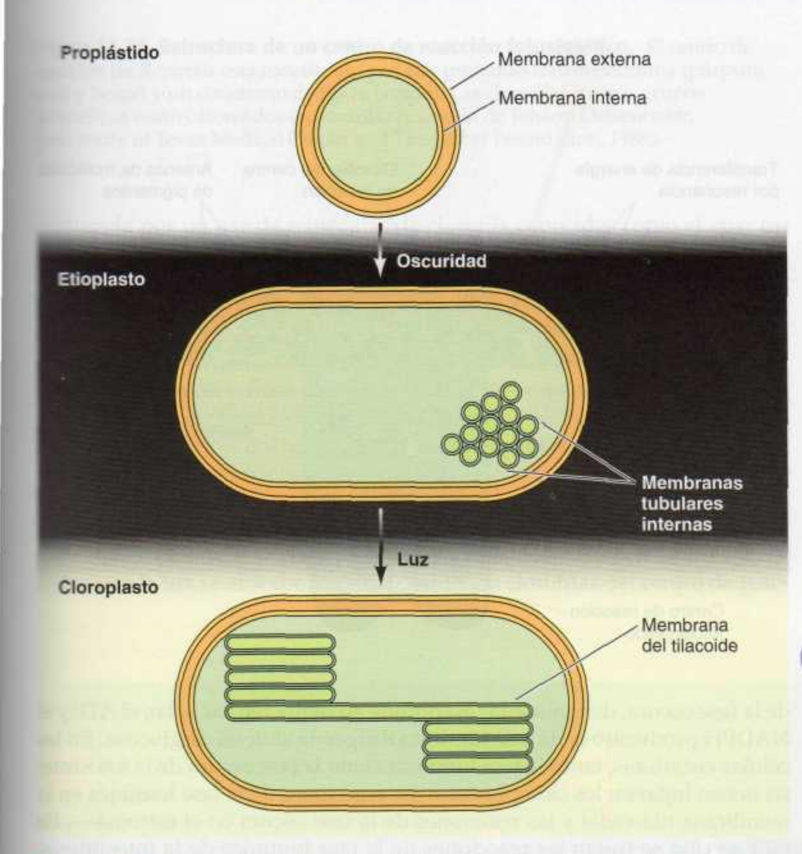


Figura 11.20 Desarrollo de los cloroplastos. Los cloroplastos se desarrollan a partir de los proplástidos en las células fotosintéticas de las hojas. Los proplástidos contienen sólo las membranas interna y externa de la envoltura; la membrana del tilacoide se forma por gemación de vesículas a partir de la membrana interna durante el desarrollo del cloroplasto. Si la planta se mantiene en la oscuridad, el desarrollo de los cloroplastos se detiene en un estadio intermedio (etioplastos). Los etioplastos no tienen clorofila y contienen unas estructuras semicristalinas de membranas tubulares. En presencia de luz, continúan su desarrollo hacia cloroplastos.



Animación web

De proplástido a cloroplasto

Un proplástido con membranas interna y externa se desarrolla en un cloroplasto maduro con un tercer sistema de membranas: *las membranas tilacoideas.*

desarrollo de los plástidos implica la expresión coordinada de genes en los genomas del plástido y nuclear. Los mecanismos responsables de esta expresión génica coordinada se desconocen por completo, y su esclarecimiento representa un desafío en la biología molecular de las plantas.

Fotosíntesis

Durante la fotosíntesis se obtiene la energía de la luz solar y se utiliza para dirigir la síntesis de glucosa a partir de CO_2 y H_2O. Al convertir la energía de la luz solar en una forma utilizable de energía potencial química, la fotosíntesis es la fuente fundamental de energía metabólica para todos los sistemas biológicos. La fotosíntesis se realiza en dos fases distintas. En las reacciones de la fase lumínica, la energía de la luz solar dirige la síntesis de ATP y NADPH, acoplada a la formación de O_2 a partir del H_2O. En las reacciones

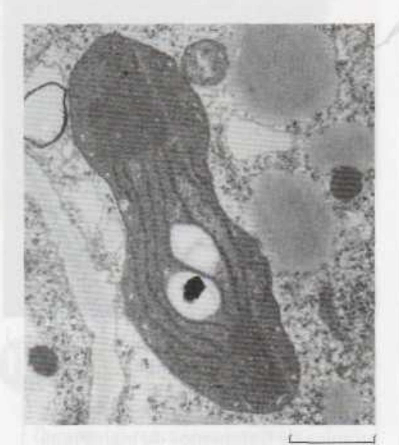


Figura 11.21 Microfotografía electrónica de un etioplasto. (John N. A. Lott/Biological Photo Service.)

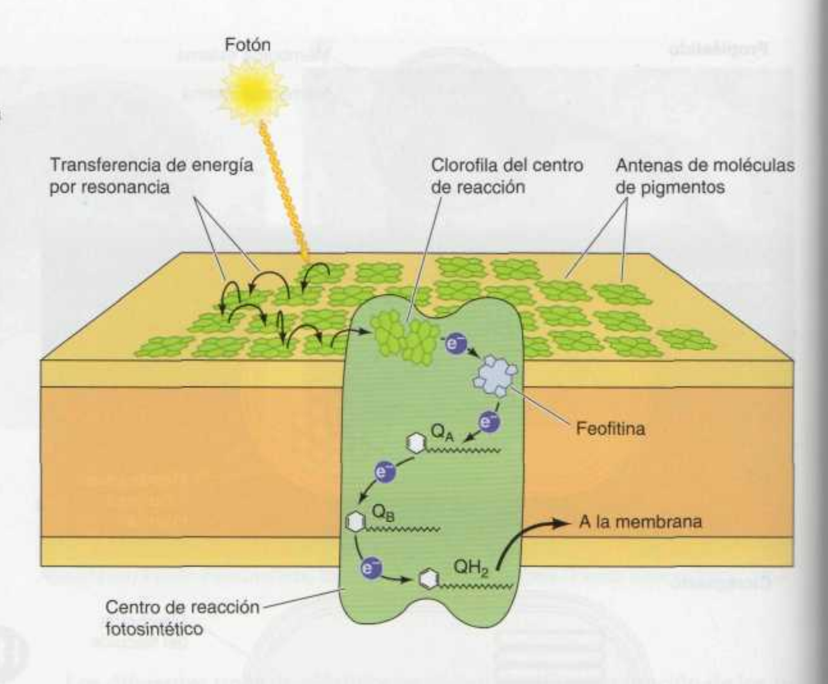


Figura 11.22 Organización de un fotocentro. Cada fotocentro está constituido por cientos de antenas de moléculas de pigmentos, que absorben los fotones y transfieren energía a la clorofila del centro de reacción. La clorofila del centro de reacción transfiere a continuación su electrón excitado a un aceptor en la cadena de transporte de electrones. Aquí se muestra el centro de reacción del fotosistema II, en el que los electrones se transfieren desde la clorofila del centro de reacción a la feofitina y después a las quinonas (Q_A, Q_B y QH_2).

de la fase oscura, denominadas así porque no requieren luz solar, el ATP y el NADPH producido en la fase lumínica dirigen la síntesis de glucosa. En las células eucariotas, tanto la fase lumínica como la fase oscura de la fotosíntesis tienen lugar en los cloroplastos —las reacciones de la fase lumínica en la membrana tilacoidal y las reacciones de la fase oscura en el estroma—. En esta sección se tratan las reacciones de la fase lumínica de la fotosíntesis, que están relacionadas con la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Las reacciones de la fase oscura se trataron en detalle en el Capítulo 3.

Flujo de electrones a través de los fotosistemas I y II

La luz solar es absorbida por los pigmentos fotosintéticos, siendo en los vegetales superiores las **clorofilas** los pigmentos más abundantes en las plantas. La absorción de la luz excita un electrón a un estado energético más elevado, convirtiendo así la energía de la luz solar en energía química potencial. Los pigmentos fotosintéticos están organizados en **fotocentros** en la membrana del tilacoide, cada uno de los cuales contiene cientos de moléculas de pigmento (Fig. 11.22). Las numerosas moléculas de pigmento en cada fotocentro actúan como antenas, absorbiendo la luz y transfiriendo la energía de sus electrones excitados a una molécula de clorofila que sirve como centro de reacción. La clorofila del centro de reacción transfiere a continuación su electrón de alta energía a una molécula aceptora de una cadena de transporte de electrones. Los electrones de alta energía se transfieren entonces a través de una serie de transportadores de membrana, acoplados a la síntesis de ATP y de NADPH.

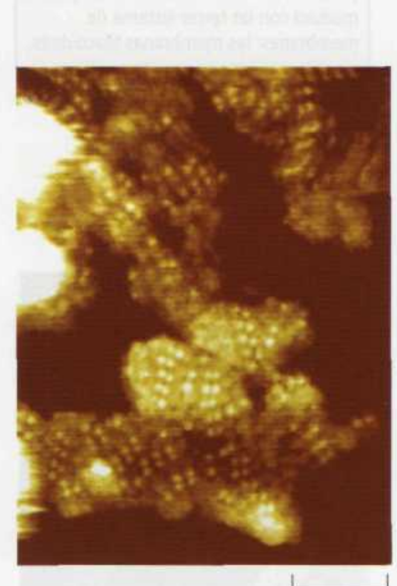


Figura 11.23 Complejos fotosintéticos. Micrografía de fuerza atómica de fragmentos de membrana fotosintética de una bacteria púrpura *Rhodobacter sphaeroides* mostrando los complejos fotosintéticos de alta densidad. (De S. Bahatyrova y cols. 2004. *Nature* 430:1059.)

Las proteínas implicadas en las reacciones lumínicas de la fotosíntesis están organizadas en complejos multiproteicos en las membranas fotosintéticas (Fig. 11.23). La reacción fotosintética caracterizada con anterioridad fue la de la bacteria *Rhodopseudomonas viridis*, cuya estructura fue determinada por Johann Deisenhofer, Hartmut Michel, Robert Huber, y sus colaboradores en 1985 (Fig. 11.24). El centro de reacción está constituido por tres polipéptidos transmembrana, unidos a un citocromo de tipo *c* que se localiza en el lado externo de la membrana. La energía procedente de la luz solar es

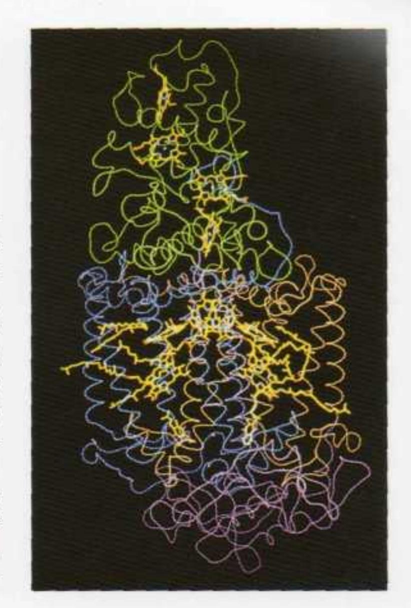


Figura 11.24 Estructura de un centro de reacción fotosintético. El centro de reacción de *R. viridis* está constituido por tres proteínas transmembrana (púrpura, azul y beige) y un citocromo de tipo *c* (verde). Las clorofilas y otros grupos prostéticos están coloreados en amarillo (Cortesía de Johann Deisenhofer, University of Texas Medical Center and The Nobel Foundation, 1989).

capturada por un par de moléculas de clorofila conocidas como el «par especial». A continuación los electrones se transfieren desde el par especial a otro par de clorofilas y desde allí a otros grupos prostéticos (feofitinas y quinonas). Desde allí los electrones se transfieren a un complejo citocromo *bc*, donde el transporte de electrones se acopla a la generación de un gradiente de protones. A continuación, los electrones son transferidos al citocromo del centro de reacción y finalmente retornan al par especial de clorofilas. Por tanto, el centro de reacción convierte la energía de la luz solar en electrones de alta energía, cuya energía potencial se convierte en un gradiente de protones por el complejo del citocromo *bc*.

En los vegetales, las proteínas que intervienen en la fase lumínica de la fotosíntesis se organizan en cinco complejos en la membrana del tilacoide (Fig. 11.25). Dos de estos complejos son fotosistemas (**fotosistemas I y II**), en los que la luz se absorbe y se transfiere a las clorofilas del centro de reac-

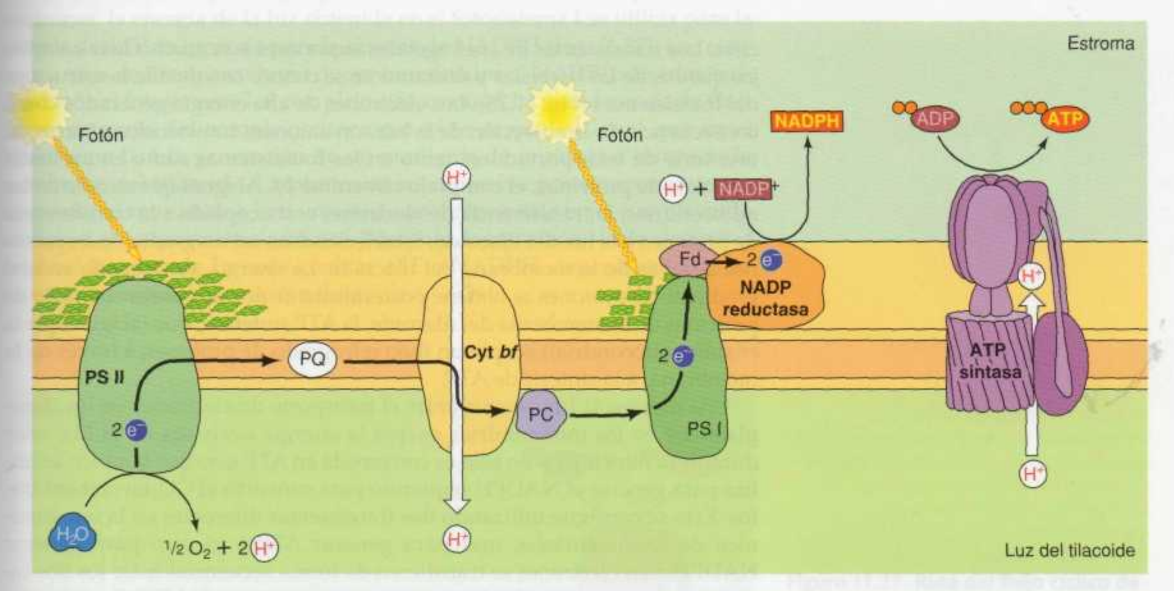


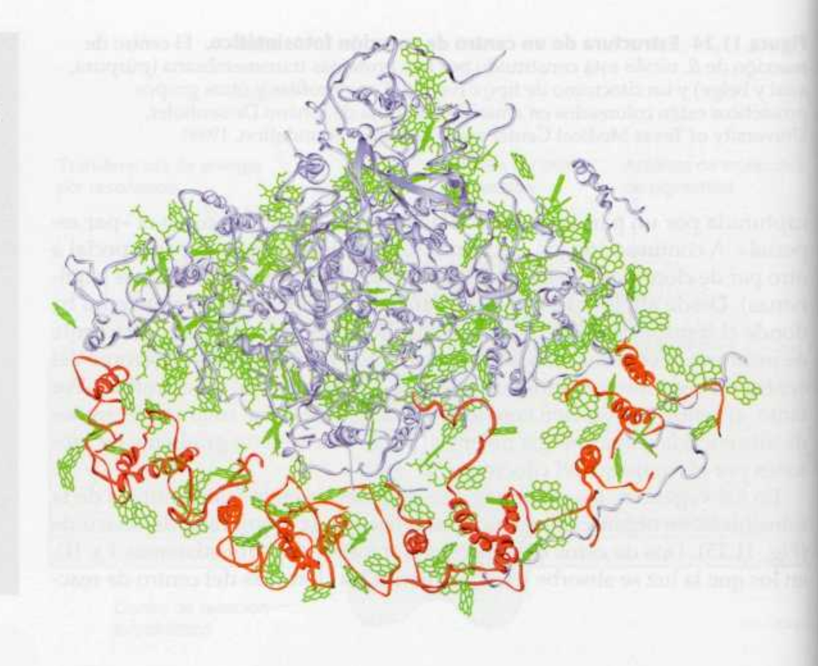
Figura 11.25 Transporte de electrones y síntesis de ATP durante la fotosíntesis. En el transporte de electrones y en la síntesis de ATP y NADPH intervienen cuatro complejos proteicos en la membrana del tilacoide. Los fotones son absorbidos por complejos de moléculas de pigmento asociadas con los fotosistemas I y II (PS I y PS II). En el fotosistema II, la energía derivada de la absorción de fotones se utiliza para escindir una molécula de agua en la luz del tilacoide. A continuación los electrones son transportados por la plastoquinona (PQ) al complejo citocromo *bf*, donde pasan a un estado energético inferior y se bombean protones al interior de la luz del tilacoide. Los electrones son transferidos después al fotosistema I mediante la plastocianina (PC). En el fotosistema I, la energía derivada de la absorción de la luz vuelve a generar electrones de alta energía, que son transferidos a la ferredoxina (Fd) y se utilizan para reducir el $NADP^+$ a NADPH en el estroma. La ATP sintetasa utiliza después la energía almacenada en el gradiente de protones para convertir el ADP en ATP.

11.2 Animación web

Reacciones lumínicas

Durante las reacciones lumínicas de la fotosíntesis, la energía absorbida de la luz solar dirige la síntesis de ATP y NADPH, acoplada a la oxidación de H_2O en O_2.

Figura 11.26 Estructura del fotosistema I de los vegetales. La imagen corresponde a la cara estromática a través de los complejos de absorción de luz. Las moléculas de clorofila se representan en verde y los complejos de absorción de luz 1-4 se muestran en rojo. (Tomado de A. Amunts, O. Drory y N. Nelson, 2007, *Nature* 447:58.)



ción. Los fotosistemas de los vegetales superiores son mucho más complejos que los de las bacterias y únicamente se conoce con detalle la estructura del fotosistema I (Fig. 11.26). Los electrones de alta energía generados como consecuencia de la absorción de la luz son entonces transferidos a través de una serie de transportadores tanto en los fotosistemas como en un tercer complejo de proteínas, el **complejo citocromo *bf***. Al igual que sucede en las mitocondrias, la transferencia de electrones está acoplada a la transferencia de protones a la luz del tilacoide, estableciéndose así un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide. La energía almacenada en este gradiente de protones se obtiene posteriormente por un cuarto complejo de proteínas de la membrana del tilacoide, la ATP sintetasa, que (al igual que la enzima mitocondrial) acopla un flujo retrógrado de protones, a través de la membrana, a la síntesis de ATP.

Una diferencia importante entre el transporte de electrones en los cloroplastos y en las mitocondrias es que la energía derivada de la luz solar durante la fotosíntesis no sólo es convertida en ATP sino que también se utiliza para generar el NADPH requerido para convertir el CO_2 en carbohidratos. Esto se consigue utilizando dos fotosistemas diferentes en la fase lumínica de la fotosíntesis, uno para generar ATP y el otro para generar NADPH. Los electrones se transfieren de forma secuencial entre los dos fotosistemas, interviniendo el fotosistema I para generar NADPH y el fotosistema II para generar ATP.

El flujo de electrones se inicia en el fotosistema II, que es homólogo al centro de reacción fotosintético de *R.viridis* ya descrito. Sin embargo, en el fotosistema II la energía derivada de la absorción de los fotones se utiliza para romper moléculas de agua en oxígeno molecular y protones (véase Fig. 11.25). Esta reacción tiene lugar en la luz del tilacoide, por lo que la liberación de protones a partir del H_2O determina un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide. Los electrones de alta energía derivados de este proceso se transfieren a través de una serie de transportadores a la plastoquinona, un transportador liposoluble similar a la coenzima Q (ubiquinona) de las mitocondrias. La plastoquinona transporta los electro-

nes desde el fotosistema II al complejo citocromo *bf*, en el que los electrones son transferidos a la plastocianina y se bombean más protones al interior de la luz del tilacoide. De esta manera, el transporte de electrones a través del fotosistema II está acoplado a la generación de un gradiente de protones, que dirige la síntesis quimiosmótica de ATP.

Desde el fotosistema II, los electrones son transportados por la plastocianina (una proteína periférica de membrana) hasta el fotosistema I, donde la absorción de otros fotones vuelve a generar electrones de alta energía. El fotosistema I, sin embargo, no actúa como una bomba de protones, sino que utiliza estos electrones de alta energía para reducir el $NADP^+$ a NADPH. La clorofila del centro de reacción del fotosistema I transfiere sus electrones excitados a través de una serie de transportadores hasta la ferredoxina, una pequeña proteína de la membrana del tilacoide que da al estroma. La enzima **NADP reductasa** transfiere después los electrones desde la ferredoxina hasta el $NADP^+$, generando NADPH. Por tanto, el paso de los electrones a través de los fotosistemas I y II genera ATP y NADPH, que son utilizados por las enzimas del ciclo de Calvin en el estroma del cloroplasto para convertir CO_2 en carbohidratos (véase Fig. 3.18).

Diversos compuestos que se unen al fotosistema II e inhiben la transferencia de electrones se utilizan como herbicidas para el control de malas hierbas.

Flujo cíclico de electrones

Una segunda ruta de transporte de electrones, denominada **flujo cíclico de electrones**, genera ATP sin la síntesis de NADPH, proporcionando de este modo ATP adicional para otros procesos metabólicos. En el flujo cíclico de electrones, la energía de la luz obtenida en el fotosistema I se utiliza para la síntesis de ATP en lugar de para la síntesis de NADPH (Fig. 11.27). Los electrones ricos en energía en lugar de ser transferidos al $NADP^+$, son transferidos desde el fotosistema I al complejo citocromo *bf*. La transferencia de electrones a través del complejo citocromo *bf* se acopla, al igual que en el fotosistema II, a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide. La plastocianina devuelve posteriormente estos electrones al fotosistema I en un estado energético más bajo, completando un ciclo de transporte de electrones. Por tanto, la transferencia de electrones desde el fotosistema I puede generar ATP o NADPH, dependiendo de las necesidades metabólicas de la célula.

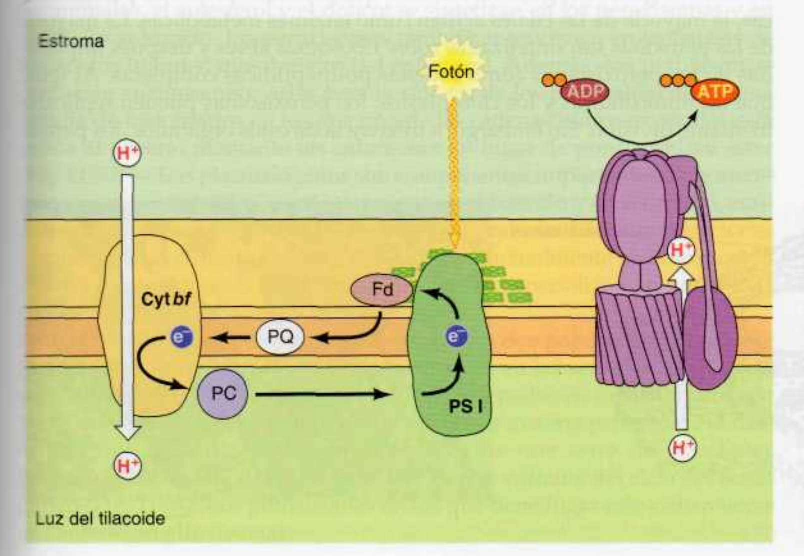


Figura 11.27 Ruta del flujo cíclico de electrones. La energía luminosa absorbida en el fotosistema I (PS I) se utiliza para la síntesis de ATP en lugar de para la síntesis de NADPH. Los electrones de alta energía generados por la absorción de fotones se transfieren al complejo citocromo *bf* en lugar de al $NADP^+$. En el complejo citocromo *bf*, los electrones pasan a un estado energético menor y se bombean protones al interior de la luz del tilacoide. Los electrones son devueltos a continuación al fotosistema I mediante la plastocianina (PC).

Síntesis de ATP

La ATP sintetasa de la membrana del tilacoide es similar a la enzima mitocondrial. Sin embargo, la energía almacenada en el gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide, a diferencia de lo que ocurre en la membrana mitocondrial interna, es de naturaleza química casi en su totalidad. Esto es debido a que la membrana del tilacoide, aunque es impermeable a los protones, difiere de la membrana mitocondrial interna en que es permeable a otros iones, concretamente al Mg^{2+} y al Cl^-. El paso libre de estos iones neutraliza el componente de voltaje del gradiente de protones, por lo que la energía derivada de la fotosíntesis se conserva principalmente como una diferencia en la concentración de protones (pH) a través de la membrana del tilacoide. Sin embargo, puesto que la luz del tilacoide es un compartimento cerrado, esta diferencia en la concentración de protones puede ser bastante grande, con una variación entre el estroma y la luz del tilacoide de más de tres unidades de pH. Dada la magnitud de este diferencial de pH, la energía libre total almacenada a través de la membrana del tilacoide es similar a la almacenada a través de la membrana mitocondrial interna.

Por cada par de electrones transportados, en el fotosistema II se transfieren dos protones a través de la membrana del tilacoide, y de dos a cuatro protones en el complejo citocromo *bf*. Puesto que se necesitan cuatro protones para dirigir la síntesis de una molécula de ATP, el paso de cada par de electrones a través de los fotosistemas I y II mediante el flujo no cíclico de electrones rinde entre 1 y 1,5 moléculas de ATP. El flujo cíclico de electrones tiene un rendimiento inferior, entre 0,5 y 1 moléculas de ATP por cada par de electrones.

Peroxisomas

Los **peroxisomas** son orgánulos pequeños, rodeados por una membrana (Fig. 11.28) que contienen enzimas implicadas en diversas reacciones metabólicas, incluyendo varios aspectos del metabolismo energético. La mayoría de las células humanas contienen unos 500 peroxisomas. Los peroxisomas no poseen su propio genoma y todas sus proteínas —denominadas **peroxinas** (Pex1, Pex2, etc.)— se codifican en el genoma nuclear. Se han identificado unos 85 genes del genoma humano que codifican proteínas perosixómicas, la mayoría de las cuales actúan como enzimas metabólicas. La mayoría de las peroxinas son sintetizadas sobre ribosomas libres y después importadas en los peroxisomas como cadenas polipeptídicas completas. Al igual que las mitocondrias y los cloroplastos, los peroxisomas pueden replicarse mediante división. Sin embargo, a diferencia de estos orgánulos, los peroxi-

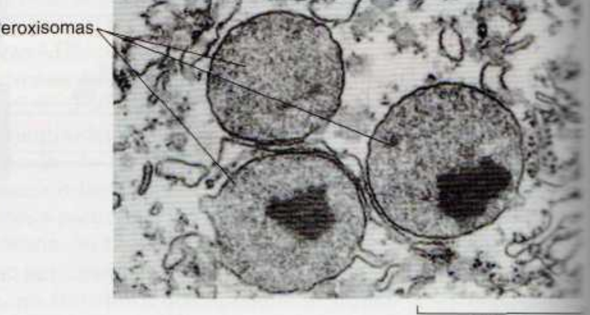


Figura 11.28 Microfotografía electrónica de los peroxisomas. Se muestran tres peroxisomas de hígado de rata. Dos contienen regiones densas, que son formaciones paracristalinas de la enzima urato oxidasa. (Don Fawcett/ Photo Researchers, Inc.)

$$R-CH_2-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-\mathbf{CoA} + O_2 \longrightarrow R-CH=CH-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-\mathbf{CoA} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalasa}} 2\,H_2O + O_2$$

o

$$H_2O_2 + AH_2 \xrightarrow{\text{Catalasa}} 2\,H_2O + A$$

Figura 11.29 Oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas. La oxidación de un ácido graso se acompaña de la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir del oxígeno. El peróxido de hidrógeno se descompone por la acción de una catalasa, bien mediante la formación de agua u oxidando otro compuesto orgánico (designado AH_2).

somas también pueden ser rápidamente regenerados aunque se hayan perdido por completo por parte de la célula. Mientras que muchas proteínas mitocondriales y plastídicas se parecen a las de los procariotas, reflejando su origen endosimbiótico, las peroxinas se parecen a las proteínas eucariotas típicas.

Funciones de los peroxisomas

Los peroxisomas contienen al menos 50 enzimas diferentes, que están implicadas en diversas rutas bioquímicas en diferentes tipos de células. Originalmente, los peroxisomas se definieron como orgánulos que llevaban a cabo reacciones oxidativas produciendo peróxido de hidrógeno. Debido a que el peróxido de hidrógeno es nocivo para la célula, los peroxisomas también contienen la enzima **catalasa**, que descompone el peróxido de hidrógeno bien convirtiéndolo en agua o utilizándolo para oxidar otro compuesto orgánico. Diversos sustratos se degradan mediante estas reacciones oxidativas en los peroxisomas, incluyendo el ácido úrico, aminoácidos y ácidos grasos. La oxidación de los ácidos grasos (Fig. 11.29) es un ejemplo especialmente importante ya que proporciona una fuente fundamental de energía metabólica. En las células animales los ácidos grasos se oxidan tanto en los peroxisomas como en las mitocondrias, pero en las levaduras y en las plantas la oxidación de los ácidos grasos está restringida a los peroxisomas.

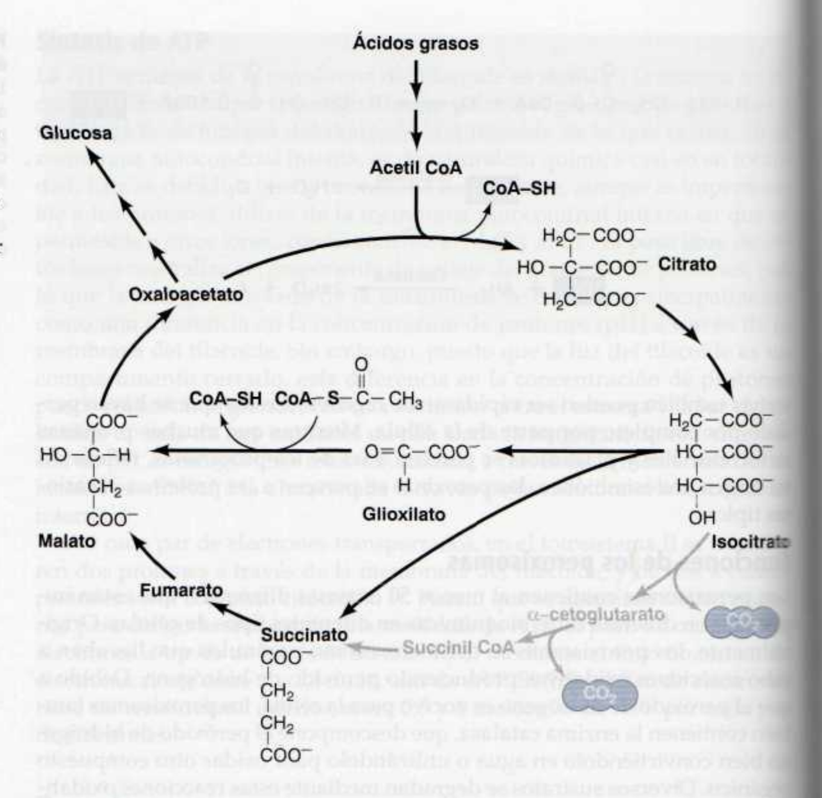
Además de proporcionar un compartimento para las reacciones de oxidación, los peroxisomas intervienen en la biosíntesis de lípidos. En las células animales, el colesterol y el dolicol se sintetizan en los peroxisomas y en el RE. En el hígado, los peroxisomas también intervienen en la síntesis de los ácidos biliares, que derivan del colesterol. Además, los peroxisomas contienen enzimas necesarias para la síntesis de los **plasmalógenos** —una familia de fosfolípidos en los que una de las cadenas hidrocarbonadas está unida al glicerol mediante un enlace éter en lugar de por un enlace éster (Fig. 11.30)—. Los plasmalógenos son componentes importantes de la membrana en algunos tejidos, particularmente en el corazón y en el cerebro, aunque están ausentes en otros. Los peroxisomas realizan diferentes reacciones bioquímicas en distintos tejidos. Sin embargo, actualmente se desconoce si existen subpoblaciones de peroxisomas que se especializan en uno o más procesos en el interior celular.

En las plantas los peroxisomas desempeñan dos papeles especialmente importantes. En primer lugar, los peroxisomas en las semillas son los responsables de convertir los ácidos grasos almacenados en carbohidratos, aspecto que es crítico para proporcionar energía y materia prima para el desarrollo de la planta. Esto ocurre a través de una serie de reacciones denominadas el **ciclo del glioxilato**, que es una variante del ciclo del ácido cítrico (Fig. 11.31). Los peroxisomas en los que tiene lugar este ciclo a veces se denominan **glioxisomas**.

$$\begin{array}{l} H_2C-O-\overset{H}{C}=\overset{H}{C}-R_1 \\ \quad | \qquad\quad O \\ \quad | \qquad\quad \| \\ HC-O-C-R_2 \\ \quad | \\ H_2C-P-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3 \end{array}$$

Figura 11.30 Estructura de un plasmalógeno. El plasmalógeno mostrado es semejante a la fosfatidilcolina. Sin embargo, una de las cadenas de ácido graso está unida al glicerol mediante un enlace éter, en lugar de por un enlace éster.

Figura 11.31 Ciclo del glioxilato. Las plantas son capaces de sintetizar carbohidratos a partir de los ácidos grasos a través del ciclo del glioxilato, que es una variante del ciclo del ácido cítrico (véase Fig. 3.13). Como sucede en el ciclo del ácido cítrico, el acetil CoA se combina con oxaloacetato para formar citrato, que es convertido en isocitrato. Sin embargo, en lugar de ser degradado a CO_2 y α-cetoglutarato (flechas grises), el isocitrato pasa a succinato y glioxilato. El glioxilato reacciona a continuación con otra molécula de acetil CoA para generar malato, que es convertido en oxaloacetato y utilizado para la síntesis de glucosa.



En segundo lugar, los peroxisomas de las hojas están implicados en la **fotorrespiración**, que sirve para metabolizar un producto derivado de la fotosíntesis (Fig. 11.32). En la fotosíntesis, el CO_2 es convertido en carbohidratos a través de una serie de reacciones denominadas ciclo de Calvin (véase Fig. 3.18). El primer paso es la adición de CO_2 al azúcar de cinco carbonos ribulosa-1,5-bifosfato, que da lugar a dos moléculas de 3-fosfoglicerato (cada una de ellas con tres carbonos). Sin embargo, la enzima responsable (ribulosa bifosfato carboxilasa o rubisco) algunas veces cataliza la adición de O_2 en lugar de CO_2, produciendo una molécula de 3-fosfoglicerato y una molécula de fosfoglicolato (dos carbonos). Esta es una reacción secundaria, y el fosfoglicolato no es un metabolito útil. Primero es convertido en glicolato y después transferido a los peroxisomas, donde se oxida y se convierte en glicina. La glicina se transfiere a las mitocondrias, donde dos moléculas de glicina son convertidas en una molécula de serina, con la pérdida de CO_2 y NH_3. La serina es devuelta a continuación a los peroxisomas, donde es convertida en glicerato. Finalmente, el glicerato retorna a los cloroplastos, donde se reintroduce en el ciclo de Calvin. La fotorrespiración no parece que sea beneficiosa para la planta, ya que esencialmente es el proceso opuesto a la fotosíntesis —se consume O_2 y se libera CO_2 sin obtener nada de ATP—. Sin embargo, la utilización ocasional del O_2 en lugar del CO_2 parece que es una característica inherente de la rubisco, por lo que la fotorrespiración suele acompañar a la fotosíntesis. Por tanto, los peroxisomas desempeñan un papel importante al permitir que la mayor parte del carbono presente en el glicolato sea recuperado y utilizado.

Formación del peroxisoma

A pesar de que la mayoría de las peroxinas se sintetizan sobre ribosomas citosólicos libres y después se importan en los peroxisomas, experimentos re-

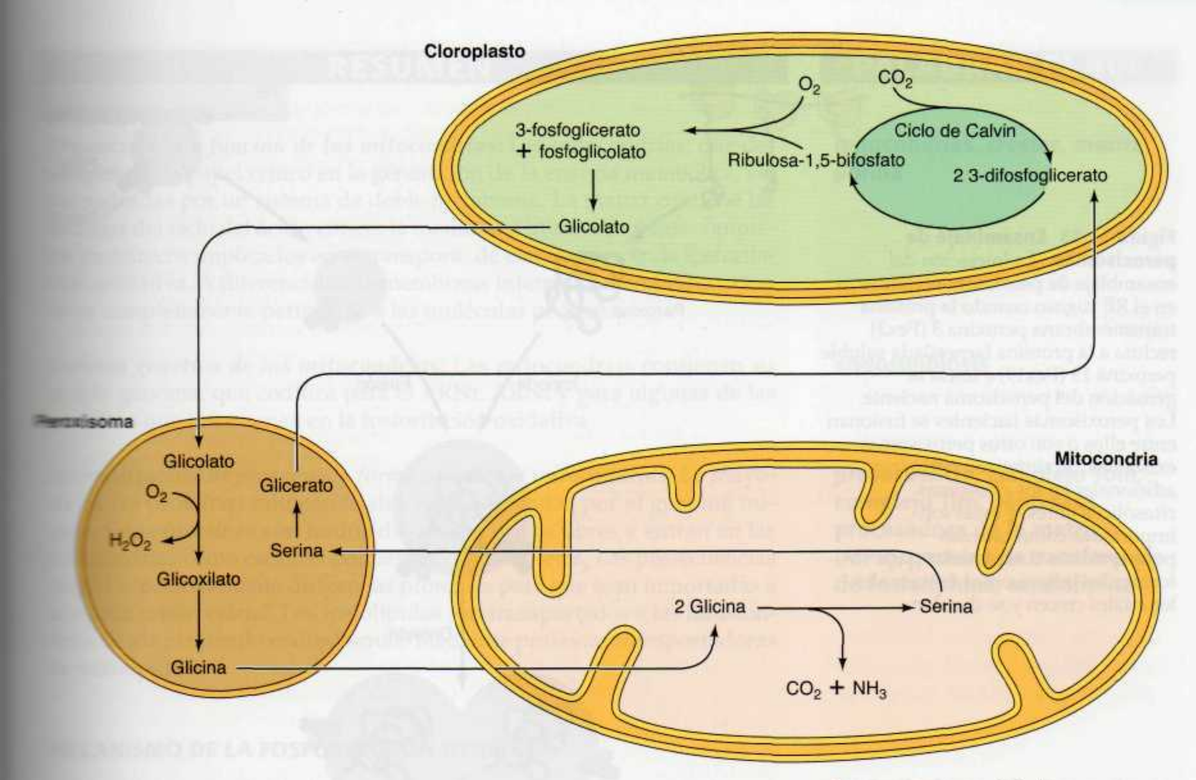


Figura 11.32 Papel de los peroxisomas en la fotorrespiración. Durante la fotosíntesis, el CO_2 es convertido en carbohidratos mediante el ciclo de Calvin, que se inicia con la adición de CO_2 al azúcar de cinco carbonos ribulosa 1,5-bifosfato. Sin embargo, algunas veces, la enzima implicada cataliza la adición de O_2 en lugar de CO_2, dando lugar al compuesto de dos carbonos fosfoglicolato. El fosfoglicolato es convertido en glicolato, que posteriormente es transferido a los peroxisomas, donde se oxida y se convierte en glicina. La glicina a *continuación es transferida* a la mitocondria y se convierte en serina. La serina es devuelta a los peroxisomas y convertida en glicerato, que es devuelto a los cloroplastos.

dientes *indican que el ensamblaje de los peroxisomas comienza en el RE* rugoso, donde dos peroxinas, Pex3 y Pex9, se localizan inicialmente (Fig. 11.33). Pex3 es una proteína transmembrana integral mientras que Pex19 es una proteína farnesilada que se encuentra principalmente en el citosol. Pex3 recluta a Pex19 a la membrana del RE, donde su interacción causa que las vesículas que contienen Pex3/Pex19 se separen por gemación del RE. Estas vesículas pueden entonces fusionarse con peroxisomas preexistentes o entre ellas para formar nuevos peroxisomas.

Pex3, Pex19 y otras proteínas de la membrana peroxisómica actúan a continuación como receptores de importe para otras peroxinas, que son traducidas sobre ribosomas citosólicos libres y después transportadas a los peroxisomas como polipéptidos completos y plegados. Se dirigen al interior de los peroxisomas por al menos dos vías, que están conservadas desde las levaduras hasta los humanos. La mayoría de las peroxinas se dirigen mediante la sencilla secuencia aminoacídica Ser-Lys-Leu en su extremo carboxilo terminal (señal peroxisómica 1, o PTS1: *peroxisome tageting signal* 1). Un pequeño número de proteínas se dirigen mediante una secuencia de nueve aminoácidos en su extremo amino terminal (señal peroxisómica 2, o PTS2). PTS1 y PTS2 son reconocidas por receptores citosólicos distintos y después pasan a través de un canal poco conocido en la membrana peroxisómica hasta la matriz. Los receptores son a continuación recuperados del peroxisoma y reciclados. A diferencia de la translocación de las cadenas polipeptídicas a través de las membranas del retículo endoplásmico, las mitocondrias y los cloroplastos, las secuencias señal generalmente no se escinden durante el importe de las proteínas en los peroxisomas, y su mecanismo de translocación es desconocido.

El importe proteico, junto con la continua adición de lípidos desde el RE rugoso, resulta en el crecimiento de los peroxisomas, y pueden formarse

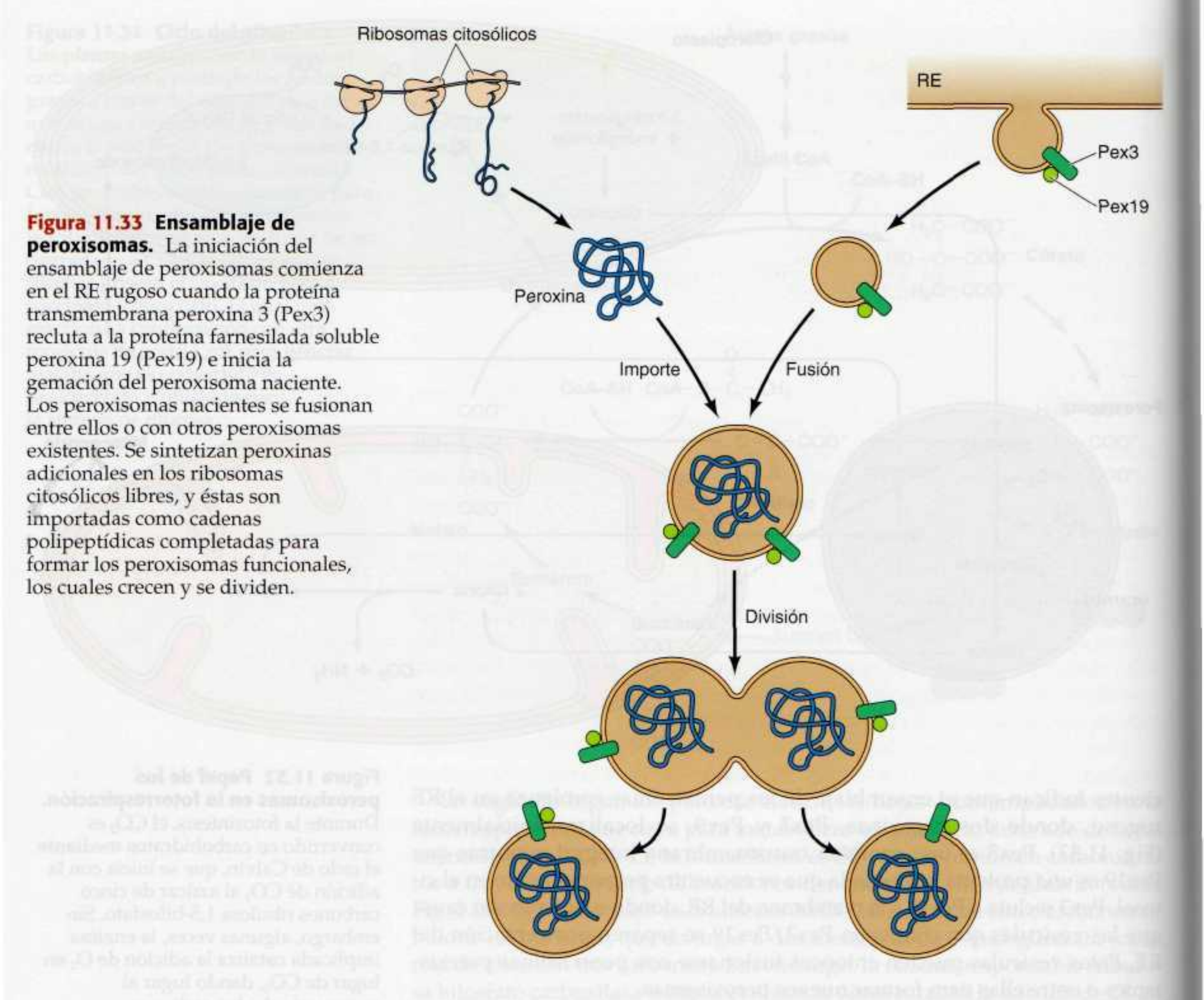


Figura 11.33 Ensamblaje de peroxisomas. La iniciación del ensamblaje de peroxisomas comienza en el RE rugoso cuando la proteína transmembrana peroxina 3 (Pex3) recluta a la proteína farnesilada soluble peroxina 19 (Pex19) e inicia la gemación del peroxisoma naciente. Los peroxisomas nacientes se fusionan entre ellos o con otros peroxisomas existentes. Se sintetizan peroxinas adicionales en los ribosomas citosólicos libres, y éstas son importadas como cadenas polipeptídicas completadas para formar los peroxisomas funcionales, los cuales crecen y se dividen.

nuevos peroxisomas a partir de la división de los antiguos. Adicionalmente, los peroxisomas sufren un complejo proceso de maduración que implica el importe de diferentes clases de proteínas desde el citosol en diferentes momentos. Como resultado, el contenido enzimático, y por tanto, las actividades citosólicas, de los peroxisomas puede variar a medida que maduran.

Hay que destacar que algunos componentes de las rutas de internalización de los peroxisomas se han identificado no sólo como mutantes en levaduras sino también como mutaciones asociadas con varias enfermedades humanas graves, relacionadas con alteraciones de los peroxisomas. En algunas de estas enfermedades sólo se produce la deficiencia de una única enzima peroxisómica. Sin embargo, en otras enfermedades ocasionadas por defectos en la función del peroxisoma, lo que ocurre es que varias enzimas del peroxisoma no entran en el orgánulo, localizándose en el citosol. Este último grupo de enfermedades se produce por deficiencias en las rutas del PTS1 y PTS2 responsables de la internalización de proteínas en los peroxisomas. El ejemplo típico es el síndrome de Zellweger, que es letal en los primeros diez años de vida. El síndrome de Zellweger puede producirse por mutaciones en, al menos, diez genes diferentes, que afectan a la internalización de proteínas en el peroxisoma, uno de los cuales se ha identificado como el gen que codifica el receptor para la señal directora PTS1.

RESUMEN

MITOCONDRIAS

Organización y función de las mitocondrias: Las mitocondrias, que desempeñan un papel crítico en la generación de la energía metabólica, están rodeadas por un sistema de doble membrana. La matriz contiene las enzimas del ciclo del ácido cítrico; la membrana interna contiene complejos proteínicos implicados en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa. A diferencia de la membrana interna, la membrana externa es completamente permeable a las moléculas pequeñas.

Palabras clave: mitocondrias, crestas, matriz, porina

Sistema genético de las mitocondrias: Las mitocondrias contienen su propio genoma, que codifica para el ARNr, ARNt y para algunas de las proteínas que intervienen en la fosforilación oxidativa.

Palabras clave: endosimbiosis

Internalización de proteínas y formación de las mitocondrias: La mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas por el genoma nuclear. Estas proteínas son traducidas en ribosomas libres y entran en las mitocondrias como cadenas polipeptídicas completas. Las presecuencias cargadas positivamente dirigen las proteínas para que sean importadas a la matriz mitocondrial. Los fosfolípidos son transportados a las mitocondrias desde el retículo endoplásmico mediante proteínas transportadoras de fosfolípidos.

Palabras clave: presecuencia, complejo Tom, complejo Tim, peptidasa procesadora de la matriz (MPP), proteína de transferencia de fosfolípidos, cardiolipina

MECANISMO DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Cadena de transporte de electrones: La mayor parte de la energía derivada del metabolismo oxidativo procede de la transferencia de electrones desde el NADH y el $FADH_2$ al O_2. Para poder disponer de esta energía, los electrones son transferidos a través de una serie de transportadores organizados en cuatro complejos proteicos en la membrana mitocondrial interna.

Palabras clave: fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones, coenzima Q, ubiquinona, citocromo *c*, citocromo oxidasa

Acoplamiento quimiosmótico: Las reacciones productoras de energía del transporte de electrones están acopladas a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La energía potencial almacenada en este gradiente se obtiene mediante un quinto complejo proteínico, la ATP sintetasa, que acopla la síntesis de ATP al retorno, energéticamente favorable, de los protones a la matriz mitocondrial.

Palabras clave: acoplamiento quimiosmótico, gradiente electroquímico, ATP sintetasa

Transporte de metabolitos a través de la membrana interna: Además de dirigir la síntesis de ATP, la energía potencial almacenada en el gradiente de protones dirige el transporte de ATP, ADP y otros metabolitos al interior y exterior de las mitocondrias.

CLOROPLASTOS Y OTROS PLÁSTIDOS

Estructura y función de los cloroplastos: Los cloroplastos son orgánulos grandes responsables de la fotosíntesis y de otras actividades metabólicas. Como sucede con las mitocondrias, los cloroplastos están rodeados por una envuelta de doble membrana. Además, los cloroplastos tienen una membrana tilacoidal interna, que es el lugar del transporte de electrones y de la generación quimiosmótica de ATP.

Palabras clave: cloroplasto, membrana del tilacoide, estroma

PALABRAS CLAVE	RESUMEN
	Genoma del cloroplasto: El genoma del cloroplasto contiene más de 100 genes, incluyendo genes que codifican ARNr, ARNt, algunas proteínas ribosómicas y algunas proteínas que intervienen en la fotosíntesis.
péptido de tránsito, complejo guía, complejo Toc, complejo Tic, peptidasa procesadora estromal (SPP)	*Internalización y distribución de las proteínas del cloroplasto:* La mayoría de las proteínas del cloroplasto son sintetizadas en ribosomas libres en el citosol, y son marcadas para que se importen a los cloroplastos mediante péptidos de tránsito amino terminales. Las proteínas incorporadas en la luz del tilacoide, primero se importan al estroma del cloroplasto y después se marcan con una segunda secuencia señal hidrofóbica para su transporte a través de la membrana del tilacoide.
plástido, cromoplasto, leucoplasto, amiloplasto, elaioplasto, proplástido, etioplasto	*Otros plástidos:* El cloroplasto es sólo uno de los miembros de una familia de orgánulos relacionados, que contienen el mismo genoma. Otros plástidos sirven para almacenar fuentes de energía, como almidón y lípidos, e intervienen en otros aspectos del metabolismo de la planta.
	FOTOSÍNTESIS
clorofila, fotocentro, fotosistema I, fotosistema II, complejo citocromo *bf*, NADP reductasa	*Flujo de electrones a través de los fotosistemas I y II:* Durante la fotosíntesis, se obtiene la energía procedente de la luz solar y se convierte en una forma utilizable de energía química potencial. La absorción de la luz por las clorofilas excita los electrones a un estado energético más elevado. Después, estos electrones de alta energía se transfieren a través de una serie de transportadores organizados en dos fotosistemas y en el complejo citocromo *bf*, en la membrana del tilacoide. El flujo secuencial de los electrones a través de ambos fotosistemas está acoplado a la síntesis de ATP en el fotosistema II y a la reducción de $NADP^+$ a NADPH en el fotosistema I. Tanto el ATP como el NADPH se utilizan para la síntesis de carbohidratos a partir de CO_2, que tiene lugar en el estroma del cloroplasto.
flujo cíclico de electrones	*Flujo cíclico de electrones:* La ruta alternativa del flujo cíclico de electrones permite que la energía de la luz obtenida en el fotosistema I sea convertida en ATP, en lugar de en NADPH.
	Síntesis de ATP: La síntesis quimiosmótica de ATP está dirigida por un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide.
	PEROXISOMAS
peroxisoma, peroxina, catalasa, plasmalógeno, ciclo del glioxilato, glioxisoma, fotorrespiración	*Funciones de los peroxisomas:* Los peroxisomas son orgánulos pequeños, rodeados por una única membrana, que contienen enzimas que intervienen en diversas reacciones metabólicas, entre las que se incluyen la oxidación de los ácidos grasos, el ciclo del glioxilato y la fotorrespiración.
	Ensamblaje del peroxisoma: El ensamblaje de peroxisomas comienza en el RE con la formación de vesículas específicas. Sin embargo, la mayoría de las proteínas peroxisómicas son sintetizadas en ribosomas libres en el citosol y se importan al peroxisoma en forma de cadenas polipeptídicas completas. Existen al menos dos tipos de señales que dirigen a las proteínas al interior de los peroxisomas, pero el mecanismo de la internalización de proteínas no se conoce bien.

Preguntas

1. ¿Qué dos propiedades de la membrana mitocondrial interna le permiten tener una actividad metabólica especialmente elevada?

2. De acuerdo con reglas *wobble* estándar, la síntesis proteica citosólica puede tener lugar con un mínimo de 30 ARNt diferentes. ¿Cómo consiguen las mitocondrias humanas traducir ARNm en proteínas con sólo 22 especies de ARNt?

3. Asuma que se ha disipado el potencial eléctrico a través de la membrana mitocondrial interna, por lo que el gradiente electroquímico está compuesto únicamente por un gradiente de concentración de protones que corresponde a una unidad de pH. Calcule la energía libre almacenada en este gradiente. Para su cálculo, utilice $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal/mol/grado, $T = 298$ °K (25 °C), y tenga en cuenta que $\ln(x) = 2{,}3 \log_{10}(x)$.

4. ¿Qué papeles juegan las chaperonas moleculares en la internalización de proteínas en la mitocondria?

5. El citocromo b_2 es sintetizado en el citosol y posee una segunda secuencia señal hidrofóbica, después de la secuencia mitocondrial de carga positiva habitual. Sugiera una vía que le llevará a su destino final en el espacio intermembrana mitocondrial.

6. ¿Cuáles son los papeles de la coenzima Q y el citocromo *c* en la cadena de transporte electrónica?

7. La ATP sintasa consiste en dos complejos multisubunidad, F_0 y F_1. ¿Dónde se localiza cada uno en la mitocondria y en el cloroplasto y cuál es la función de cada uno de ellos?

8. ¿Por qué los péptidos de tránsito de las proteínas de los cloroplastos, a diferencia de las presecuencias de las proteínas mitocondriales, no están cargados positivamente?

9. ¿Cuántos electrones de alta energía son necesarios para dirigir la síntesis de una molécula de glucosa durante la fotosíntesis, acoplada a la formación de seis moléculas de O_2? ¿Cuántas moléculas de ATP y NADPH genera el paso de estos electrones a través de los fotosistemas I y II?

10. ¿Qué fracción de los átomos de carbono convertidos en glicolato durante la fotorrespiración son recuperados por los peroxisomas?

11. ¿Cómo se dirigen las proteínas a los peroxisomas?

12. ¿Por qué la energía almacenada a través de la membrana tilacoidea es prácticamente toda química?

Bibliografía

Mitocondrias

Berman, S. B., F. J. Pineda and J. M. Hardwick. 2008. Mitochondrial fission and fusion dynamics: the long and short of it. *Cell Death. Differ*. 15: 1147–1152. [R]

Bolender, N., A. Sickmann, R. Wagner, C. Meisinger and N. Pfanner. 2008. Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep*. 9: 42–49. [R]

Chan, D. C. 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol*. 22: 79–99. [R]

Chen, X. J. and R. A. Butow. 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Rev. Genet*. 6: 815–825. [R]

Hoppins, S., L. Lackner and J. Nunnari. 2007. The machines that divide and fuse mitochondria. *Ann. Rev. Biochem*. 76: 751–780. [R]

Howell, N., J. L. Elson, P. F. Chinnery and D. M. Turnbull. 2005. mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders. *Trends Genet*. 21: 583–586. [R]

Jensen, R. E., C. D. Dunn, M. J. Youngman and H. Sesaki. 2004. Mitochondrial building blocks. *Trends Cell Biol*. 14: 215–218. [R]

Millar, A. H., J. L. Heazlewood, B. K. Kristensen, H. P. Braun and I. M. Moller. 2005. The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci*. 10: 36–43. [R]

Neupert, W. and J. M. Herrmann. 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Ann. Rev. Biochem*. 76: 723–749. [R]

Pagliarini, D. J. and 15 others. 2008. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134: 112–123. [P]

Wilson, F. H., A. Hariri, A. Farhi, H. Zhao, K. F. Petersen, H. R. Toka, C. Nelson-Williams, K. M. Raja, M. Kashgarian, G. I. Shulman, S. J. Scheinman and R. P. Lifton. 2004. A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. *Science* 306: 1190–1194. [P]

Yi, L. and R. E. Dalbey. 2005. Oxa1/Alb3/YidC system for insertion of membrane proteins in mitochondria, chloroplasts and bacteria (review). *Mol. Membrane Biol*. 22: 101–111. [R]

Young, J. C., N. J. Hoogenraad and F. U. Hartl. 2003. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112: 41–50. [P]

Mecanismo de la fosforilación oxidativa

Junge, W. and N. Nelson. 2005. Structural biology: Nature's rotary electromotors. *Science* 308: 642–644. [R]

Mitchell, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206: 1148–1159. [R]

Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 2002. *Bioenergetics*, 3rd ed. London: Academic Press.

O'Rourke, B. 2007. Mitochondrial ion channels. *Ann. Rev. Physiol* 69: 19–49. [R]

Racker, E. 1980. From Pasteur to Mitchell: A hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc*. 39: 210–215. [R]

Vogel, R., L. Nijtmans, L., Ugalde, C., L. van den Heuvel and J. Smeitink. 2004. Complex I assembly: A puzzling problem. *Curr. Opin. Neurol*. 17: 179–186. [R]

Weber, J. 2007. ATP synthase—the structure of the stator stalk. *Trends Biochem. Sci*. 32: 53–56. [R]

Cloroplastos y otros plástidos

Jarvis, P. and C. Robinson. 2004. Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr. Biol*. 14: R1064–R1077. [R]

Jarvis, P. and J. Soll. 2002. Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 1590: 177–189. [R]

Kessler, F. and D. J. Schnell. 2004. Chloroplast protein import: Solve the GTPase riddle for entry. *Trends Cell Biol*. 14: 334–338. [R]

Qbadou, S., T. Becker, O. Mirus, I. Tews, J. Soll and E. Schleiff. 2006. The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. *EMBO J*. 25: 1836–1847. [P]

Rochaix, J.-D. 1992. Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes. *Ann. Rev. Cell Biol*. 8: 1–28. [R]

Schleiff, E. and J. Soll. 2005. Membrane protein insertion: Mixing eukaryotic and prokaryotic concepts. *EMBO Rep*. 6: 1023–1027. [R]

van Dooren, G. G., S. D. Schwartzbach, T. Osafune and G. I. McFadden. 2001. Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim. Biophys. Acta* 1541: 34–53. [R]

Fotosíntesis

Allen, J. F. and J. Forsberg. 2001. Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* 6: 317–326. [R]

Arnon, D. I. 1984. The discovery of photosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 9: 258–262. [R]

Bahatyrova, S., R. N. Frese, C. A. Siebert, J. D. Olsen, K. O. Van der Werf, G. R. Van, R. A. Niederman, P. A. Bullough, C. Otto and C. N. Hunter. 2004. The native architecture of a photosynthetic membrane. *Nature* 430: 1058–1062. [P]

Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel. 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis*. *Nature* 318: 618–624. [P]

Minagawa, J. and Y. Takahashi. 2004. Structure, function and assembly of photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynth. Res.* 82: 241–263. [R]

Nelson, N. and C. F. Yocum. 2006. Structure and function of photosystems I and II. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57: 521–565. [R]

Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 2002. *Bioenergetics*, 3rd ed. San Diego: Academic Press.

Peroxisomas

Fujiki, Y., Y. Matsuzono, T. Matsuzaki and M. Fransen. 2006. Import of peroxisomal membrane proteins: The interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 1639–1646. [R]

Hoepfner, D., D. Schildknegt, L. Braakman, P. Philippsen and H. F. Tabak. 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 122: 85–95. [P]

Platta, H. W. and R. Erdmann. 2007. The peroxisomal protein import machinery. *FEBS Lett.* 581:2811–2819. [R]

Schekman, R. 2005. Peroxisomes: Another branch of the secretory pathway? *Cell* 122: 1–2. [R]

Wickner, W. and R. Schekman. 2005. Protein translocation across biological membranes. *Science* 310: 1452–1456. [R]

CAPÍTULO 12

Citoesqueleto y movimiento celular

Los orgánulos intracelulares de los que se ha hablado en los capítulos precedentes constituyen un nivel de la estructura subcelular de las células eucariotas. Un nivel de organización más avanzado lo proporciona el citoesqueleto, que consiste en una red de filamentos de proteína que se extienden por el citoplasma de todas las células eucariotas. El citoesqueleto proporciona un armazón estructural para la célula, actuando como un andamio que determina la forma celular y la organización general del citoplasma. Además de desempeñar este papel estructural, el citoesqueleto es el responsable de los movimientos de la célula. Estos no solamente incluyen los movimientos de la célula en conjunto, sino también el transporte interno de los orgánulos y de otras estructuras (tales como los cromosomas mitóticos) a través del citoplasma. Es importante señalar que el citoesqueleto es mucho menos rígido y estable de lo que su nombre indica. Más bien es una estructura dinámica que se reorganiza continuamente según las células se mueven y cambian su forma, por ejemplo durante la división celular.

El citoesqueleto está constituido por tres tipos principales de filamentos de proteína: filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos, que se mantienen juntos y unidos a los orgánulos intracelulares y a la membrana plasmática mediante varias proteínas accesorias. Este capítulo trata sobre la estructura y la organización de cada uno de los tres componentes principales del citoesqueleto, así como del papel que desempeñan en la motilidad celular, en el transporte de orgánulos, en la división celular y en otros tipos de movimientos celulares.

Estructura y organización de los filamentos de actina

La proteína citoesquelética más importante de la mayoría de las células es la **actina**, que polimeriza para formar filamentos de actina —fibras delgadas y flexibles de aproximadamente 7 nm de diámetro y hasta varios micrómetros de longitud (Fig. 12.1)—. Dentro de la célula, los filamentos de actina (también llamados **microfilamentos**) se organizan en estructuras de un orden superior, formando haces o redes tridimensionales con las propiedades de un gel semisólido. El ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina, sus uniones cruzadas constituyendo haces y redes, y su asociación con otras estructuras celulares (tales como la membrana plasmática) se regulan mediante diversas proteínas de unión a la actina, que son componentes críticos del citoesqueleto de actina. Los filamentos de actina abundan sobre todo debajo de la membrana plasmática, donde forman una red que

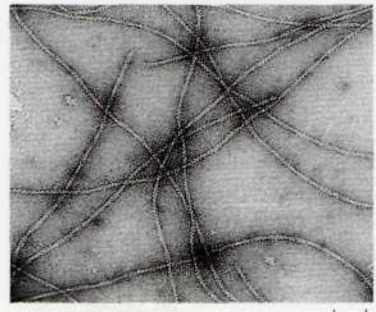


Figura 12.1 Filamentos de actina. Micrografía electrónica de filamentos de actina. (Cortesía de Roger Craig, University of Massachusetts Medical Center.)

proporciona un soporte mecánico, determina la forma celular y permite el movimiento de la superficie celular, lo que permite a las células migrar, engullir partículas y dividirse.

Ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina

La actina se aisló por primera vez en 1942 a partir de células musculares, en las que constituye aproximadamente el 20% de la proteína total de la célula. Aunque en un principio se pensó que la actina estaba implicada únicamente en la contracción muscular, ahora se sabe que es una proteína muy abundante (en general entre un 5% y un 10% de la proteína total) en toda clase de células eucariotas. Las levaduras sólo tienen un gen para la actina, pero los eucariotas superiores tienen varios tipos distintos de actina que se encuentran codificados por distintos miembros de la familia de los genes de la actina. Los mamíferos, por ejemplo, tienen al menos seis genes de actina diferentes: cuatro se expresan en distintos tipos de músculo y dos se expresan en células no musculares. Sin embargo, todas las actinas tienen una secuencia de aminoácidos similar y se han mantenido muy conservadas a lo largo de la evolución de los eucariotas. Por ejemplo, la actina de la levadura tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en un 90% a la de las actinas de las células de los mamíferos. El ancestro procariótico de la actina es una proteína denominada MreB, que es la responsable de la estructura bacilar de las bacterias.

La estructura tridimensional tanto de las moléculas individuales como de los filamentos de actina fueron determinadas en 1990 por Kenneth Holmes, Wolfgang Kabsch y sus colaboradores. Las moléculas individuales de actina son proteínas globulares de 375 aminoácidos (43 kDa). Cada monómero (**actina globular G**) tiene sitios de unión que median la interacción cabeza con cola con otros dos monómeros de actina, de tal manera que los monómeros de actina polimerizan para formar filamentos (**actina filamentosa F**) (Fig. 12.2). En los filamentos cada monómero se encuentra girado 166°, por lo que los filamentos tienen la apariencia de una hélice de doble cadena. Debido a que todos los monómeros de actina están orientados en la misma dirección, los filamentos de actina presentan una polaridad diferenciada y sus extremos (denominados extremos protuberantes y extremos puntiagudos) se distinguen entre sí. Esta polaridad de los filamentos de actina es importante tanto para su ensamblaje como para establecer una dirección única en el movimiento de la miosina respecto a la actina, como se tratará más adelante en el capítulo.

> **12.1 Animación web**
> **Ensamblaje de un filamento de actina**
> Los monómeros de actina polimerizan para formar filamentos de actina, un proceso que es reversible y está regulado en el interior celular por las proteínas de unión a la actina.

Mientras que los monómeros y filamentos de actina están altamente controlados en el interior celular, gran parte de su comportamiento es una propiedad de los propios monómeros y filamentos de actina. En soluciones de baja fuerza iónica los filamentos de actina se despolimerizan a monómeros. La actina polimeriza espontáneamente si se aumenta la fuerza iónica hasta niveles fisiológicos. El primer paso en la polimerización de la actina (denominado nucleación) es la formación de un pequeño agregado constituido por tres monómeros de actina. Los filamentos de actina son entonces capaces de crecer por la adición reversible de monómeros a ambos extremos, pero el extremo protuberante crece de cinco a diez veces más rápido que el extremo puntiagudo. Los monómeros de actina también unen ATP, el cual se hidroliza a ADP tras el ensamblaje del filamento. Aunque el ATP no es necesario para la polimerización, los monómeros de actina que tienen unido ATP polimerizan más rápido que aquellos que tienen unido ADP. Como se describe a continuación, la unión y la hidrólisis del ATP desempeñan un papel clave en la regulación del ensamblaje y en el comportamiento dinámico de los filamentos de actina.

Debido a que la polimerización de la actina es reversible, los filamentos pueden despolimerizar por la disociación de las subunidades de actina, lo

(A)

Actina G Dímero Trímero

Extremo puntiagudo

Extremo protuberante

Actina F

(B)

Extremo puntiagudo

C

N

Extremo protuberante

(C)

Figura 12.2 Ensamblaje y estructura de los filamentos de actina. (A) Los monómeros de actina (actina G) polimerizan para formar filamentos de actina (actina F). El primer paso es la formación de dímeros y trímeros, que crecen por la adición de monómeros a ambos extremos. (B) Estructura de un monómero de actina. (C) Modelo espacial de una actina F. Se representan catorce monómeros de actina en diferentes colores. (C, Basado en datos de Chen y cols., 2002. *J. Struct. Biol.* 138:92.)

que permite que los filamentos de actina se descompongan cuando sea necesario (Fig. 12.3). *In vitro*, existe un equilibrio aparente entre los monómeros de actina y los filamentos, que depende de la concentración de los monómeros libres. La velocidad a la que los monómeros de actina se incorporan a los filamentos es proporcional a su concentración, por lo que hay una concentración crítica de monómeros de actina a la cual la velocidad de polimerización es igual a la velocidad de disociación. A esta concentración crítica, los monómeros y los filamentos se encuentran en un equilibrio aparente.

Como se mencionó anteriormente, los dos extremos de un filamento de actina crecen a velocidades diferentes, de tal manera que los monómeros se añaden al extremo de crecimiento rápido (el extremo protuberante) de cinco a diez veces más rápido que al extremo puntiagudo de crecimiento lento.

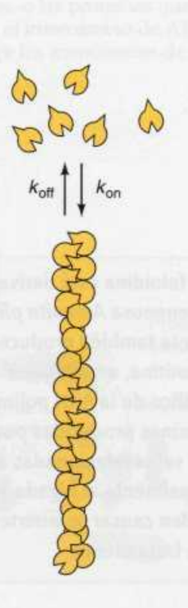


Figura 12.3 Polimerización reversible de los monómeros de actina. La polimerización de la actina es un proceso reversible, en el que los monómeros se asocian y disocian de los extremos de los filamentos de actina. La velocidad de disociación de las subunidades (k_{off}) es independiente de la concentración de monómeros, mientras que la velocidad de asociación de las subunidades es proporcional a la concentración de monómeros libres y viene dada por $C \times k_{on}$ (C = concentración de monómeros libres). A la concentración crítica de monómeros (C_c), donde $k_{off} = C_c \times k_{on}$, se alcanza un equilibrio aparente.

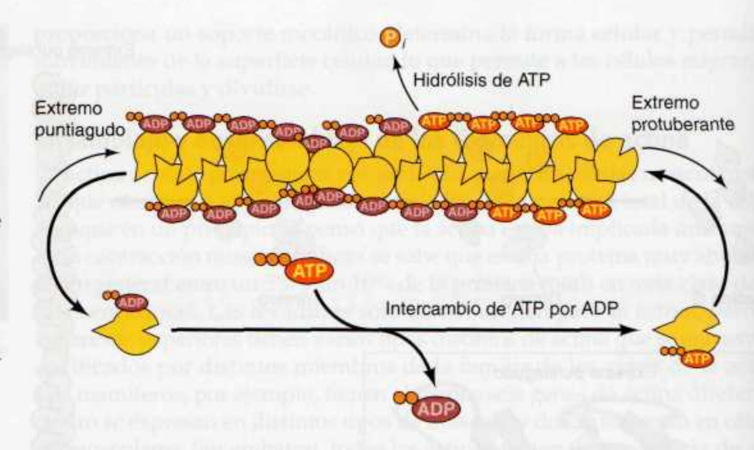


Figura 12.4 *Treadmilling* y papel del ATP en la polimerización de los microfilamentos. Los extremos puntiagudos de los filamentos de actina crecen a una velocidad menor que los extremos protuberantes. Esta diferencia en la tasa de crecimiento se refleja en una diferencia en la concentración crítica para la adición de monómeros a ambos extremos del filamento. La actina unida a ATP se asocia con lo extremos protuberantes de crecimiento rápido, y el ATP unido a la actina es a continuación hidrolizado a ADP. Puesto que la ADP-actina se disocia de los filamentos con mayor facilidad que la ATP-actina, la concentración crítica de los monómeros de actina es mayor para la adición a los extremos puntiagudos que en los extremos protuberantes de los filamentos de actina. El *treadmilling* tiene lugar a concentraciones monoméricas intermedias entre las concentraciones críticas de los extremos protuberantes y puntiagudos. Bajo estas condiciones, existe una disociación neta de monómeros (unidos a ADP) del extremo puntiagudo, equilibrada por la adición de monómeros (unidos a ATP) al extremo protuberante.

■ La faloidina está derivada de la seta venenosa *Amanita phalloides*. Esta seta también produce α-amanitina, un inhibidor específico de la ARN polimerasa II. Las toxinas producidas por esta seta y setas relacionadas atacan principalmente al hígado y la riñón y pueden causar la muerte si no se recibe tratamiento.

Debido a que la actina-ATP se disocia con menos facilidad que la actina-ADP, la concentración crítica de monómeros que es necesaria para la polimerización de los dos extremos será diferente. Esta diferencia puede dar lugar al fenómeno conocido como **intercambio rotatorio (*treadmilling*)**, que ilustra el comportamiento dinámico de los filamentos de actina (Fig. 12.4). Para que el sistema se encuentre en un estado de equilibrio general, la concentración de monómeros de actina libres debe ser intermedia entre las concentraciones críticas requeridas para la polimerización de los extremos protuberantes y puntiagudos de los filamentos de actina. Bajo estas condiciones existe una pérdida neta de monómeros del extremo puntiagudo, que se compensa con una adición neta al extremo protuberante. El intercambio rotatorio requiere ATP, polimerizando la actina-ATP en el extremo protuberante de los filamentos mientras que la actina-ADP se disocia del extremo puntiagudo. A pesar de que la tasa de intercambio rotatorio espontáneo es excesivamente baja para dotar a este fenómeno de relevancia fisiológica, la polimerización y despolimerización reguladas de filamentos son importantes para la formación de procesos celulares y en el movimiento celular (como se analizará en una sección posterior de este capítulo).

Es de reseñar que varios fármacos que se utilizan en biología celular actúan uniéndose a la actina y afectando a su polimerización. Por ejemplo, las **citocalasinas** se unen a los extremos protuberantes de los filamentos y bloquean su elongación. Esto provoca cambios en la forma de la célula así como la inhibición de algunos tipos de movimientos celulares (p. ej., la división celular que sigue a la mitosis), lo que indica que la polimerización de la actina es necesaria para estos procesos. Otro fármaco, la **faloidina**, se une fuertemente a los filamentos de actina y evita su disociación en moléculas individuales de actina. La faloidina marcada con un marcador fluorescente se suele utilizar para visualizar los filamentos de actina mediante microscopia de fluorescencia.

En el interior celular, la concentración de filamentos de actina y monómeros dista mucho del equilibrio. En partes de la célula, la tasa de renovación de filamentos de actina puede ser 100 veces mayor de lo que es *in vitro* mientras que en otras partes de la célula, los filamentos pueden estar estabilizados frente al desensamblaje. El ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina en el interior celular está regulado por un grupo diverso de **proteínas de unión a actina** (Tabla 12.1). Estas proteínas pueden regular la formación y la estabilidad del citoesqueleto de actina a varios niveles diferentes (Fig. 12.5). Algunas de estas proteínas se unen a lo largo de los filamentos de actina, estabilizándolos o estableciendo enlaces cruzados entre ellos. Otras proteínas de unión a actina estabilizan a los filamentos formando una caperuza en sus

Tabla 12.1 Proteínas de unión a actina

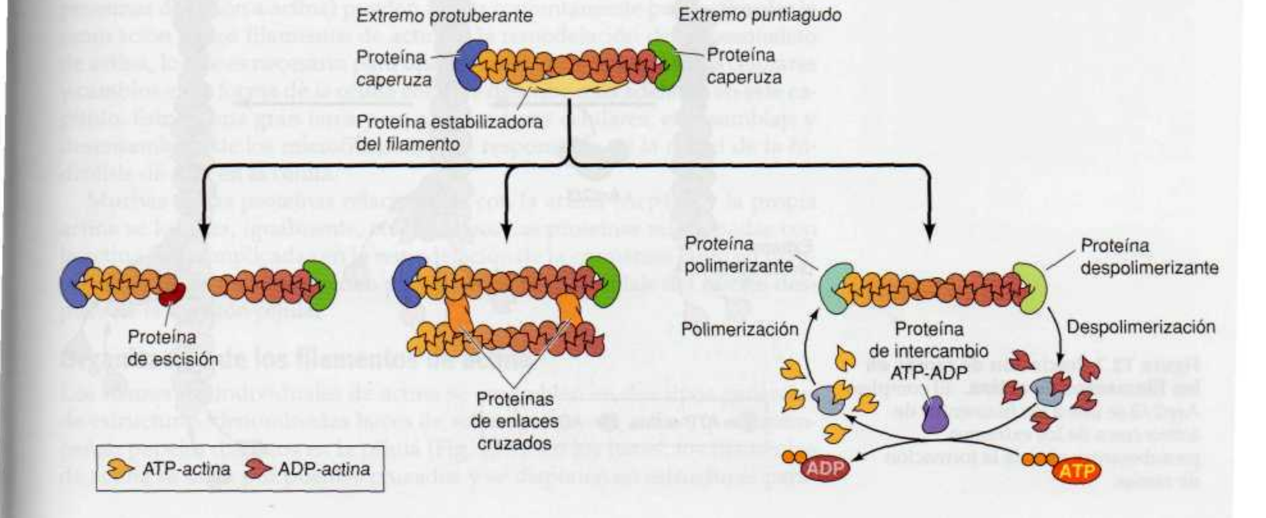
Papel en la célula	Proteínas representativas
Iniciación y polimerización de filamentos	Arp2/3, formina
Estabilización de filamentos	Nebulina, tropomiosina
Formación de enlaces cruzados de filamentos	α-actinina, filamina, fimbrina, villina
Caperuzas	CapZ, tropomodulina
Escisión/despolimerización de filamentos	ADF/cofilina, gelsolina, limosina
Unión de monómeros	Profilina, twinfilina
Unión de filamentos de actina a proteínas	Distrofina, espectrina, talina, vinculina

extremos que previene la disociación de monómeros de actina. Por el contrario, algunas proteínas actúan para desensamblar los filamentos de actina escindiéndolos o estimulando su despolimerización. Finalmente, algunas proteínas de unión a actina se unen a la actina monomérica y controlan su ensamblaje en filamentos regulando el intercambio de ATP por ADP.

El paso inicial y limitante en la formación de filamentos de actina es la nucleación, que requiere que los monómeros interaccionen correctamente. Dos tipos de proteínas, la **formina** y el **complejo Arp2/3** (*actin-related protein*), determinan dónde se forman los filamentos en el interior celular al facilitar su nucleación. Las forminas son una familia de proteínas grandes (140-200 kd) de unión a los extremos protuberantes presentes en todas las células eucarióticas que tanto nuclean los monómeros iniciales de actina como, a continuación, se desplazan a lo largo del filamento en crecimiento, añadiendo monómeros nuevos en el extremo protuberante (Fig. 12.6). Se cree que las forminas nuclean filamentos de actina largos carecientes de ramificaciones (véase Fig. 12.1) que componen las fibras de estrés, los anillos contráctiles, los filopodios y los filamentos finos de las células musculares (analizados más adelante en este capítulo). Muchos de estos filamentos son relativamente estables debido a las proteínas estabilizadoras de los filamentos, como miembros de la familia **tropomiosina**. Las tropomiosinas son proteínas fibrosas de 30-36 kd que se unen longitudinalmente a lo largo de la hendidura de los filamentos de actina.

Por el contrario, en el extremo de avance de los procesos celulares o de las células en movimiento, los filamentos de actina se recambian y ramifi-

Figura 12.5 Regulación de la organización de los filamentos de actina por las proteínas de unión a actina. Las proteínas de unión a actina juegan diversos papeles en el comportamiento dinámico de los filamentos de actina. Los filamentos de actina pueden ser estabilizados por proteínas estabilizadoras de los filamentos que se unen a lo largo de ellos. Tanto los extremos protuberantes como puntiagudos pueden también tener caperuzas y los propios filamentos pueden formar enlaces cruzados entre sí. Los filamentos intactos también pueden ser escindidos por proteínas de escisión de los filamentos. El equilibrio entre los monómeros de actina y los filamentos puede estar regulado por las proteínas despolimerizantes de los filamentos, las proteínas polimerizantes de los filamentos, o las proteínas que modulan el intercambio de ATP por ADP sobre los monómeros de actina.



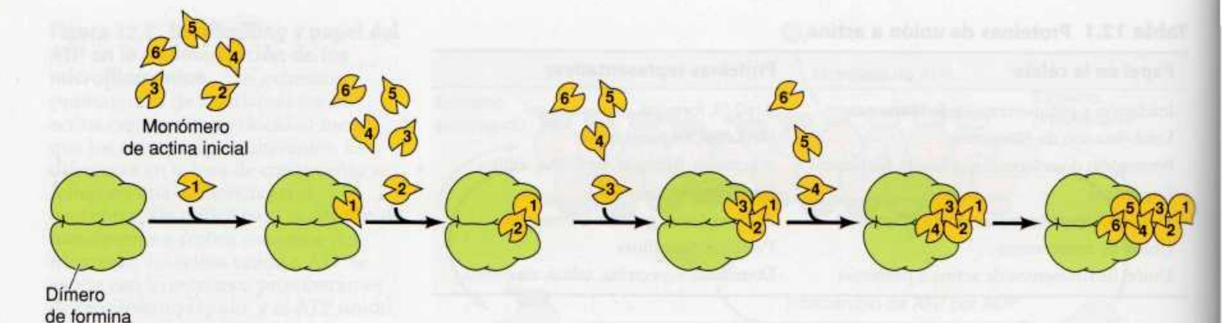


Figura 12.6 Iniciación de los filamentos de actina por la formina. El paso limitante de la formación de los filamentos de actina es la nucleación, que requiere el alineamiento correcto de los tres primeros monómeros de actina para permitir la posterior polimerización. En el interior celular, la nucleación está facilitada por la proteína de unión a actina, formina. Cada subunidad del dímero de formina se une a un monómero de actina. Los monómeros de actina se mantienen en la configuración correcta para permitir la unión del tercer monómero, seguido de una rápida polimerización durante la cual la formina sigue unida al extremo protuberante.

can extensamente. Los filamentos de actina densamente empaquetados y altamente ramificados en estas áreas son nucleados por el complejo Arp2/3, que se une a la actina/ATP cerca de los extremos protuberantes de los microfilamentos (Fig. 12.7). El complejo Arp2/3 contiene siete proteínas, dos de las cuales son similares a la actina. El complejo en sí tiene una actividad muy baja pero es estimulado por diversas proteínas que se unen a él y lo activan. Una vez activado, el complejo Arp2/3 se une al lado de un filamento de actina existente cerca del extremo protuberante y forma una nueva rama.

Otro tipo de proteínas de unión a actina remodela o modifica los filamentos existentes. Una familia responsable de la remodelación de filamentos de actina en el interior celular es la famila **ADF/cofilina** (*actin depolymerizing factor*) (Fig. 12.8). Estas proteínas se unen a los filamentos de actina y favorecen la tasa de disociación de los monómeros de actina/ADP del extremo puntiagudo. La ADF/cofilina también es capaz de escindir filamentos de actina. La ADF/cofilina se une preferentemente a la ADP/actina, de modo que permanece unida a los monómeros de actina después del desensamblaje de los filamentos y los secuestra en la forma unida a ADP, impidiendo su reincorporación en filamentos. Sin embargo, otra proteína de unión a actina, la **profilina**, puede revertir este efecto de la cofilina y estimular la incorporación de monómeros de actina en filamentos. La profilina actúa estimulando el intercambio de ADP por ATP y disociando los monómeros de actina/ATP de la cofilina, de tal modo que se encuentran disponibles para

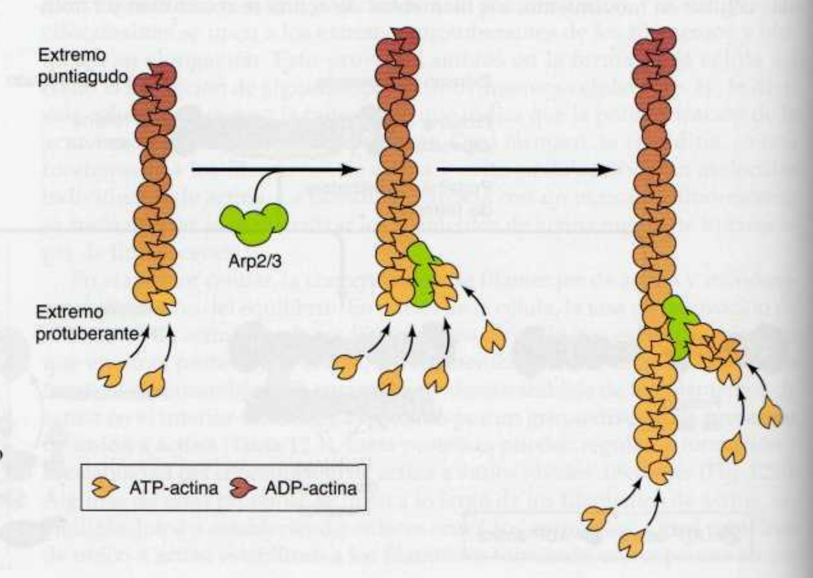


Figura 12.7 Iniciación de ramas en los filamentos de actina. El complejo Arp2/3 se une a los filamentos de actina cerca de los extremos protuberantes e inicia la formación de ramas.

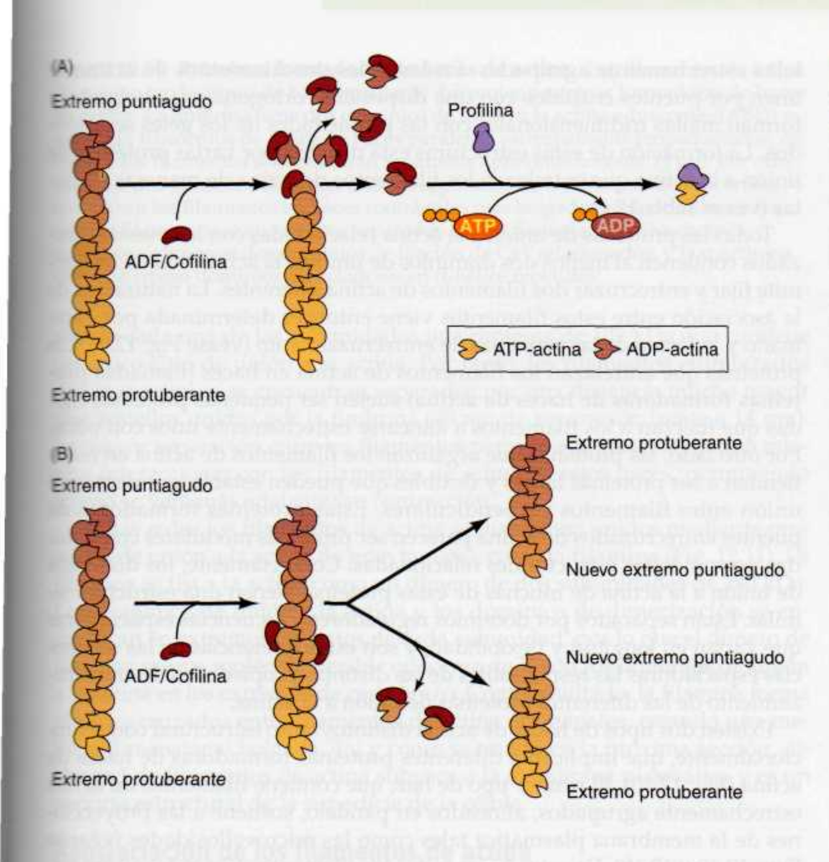


Figura 12.8 Efectos de la ADF/cofilina y la profilina sobre los filamentos de actina. La ADF/cofilina posee dos actividades diferentes. (A) Es un factor (ADF) de despolimerización de la actina, uniéndose a los filamentos de actina y aumentando la tasa de disociación de monómeros de actina desde el extremo puntiagudo. La ADF/cofilina permanece unida a los monómeros de ADP/actina, impidiendo su *reinserción en los filamentos.* La profilina puede estimular el *intercambio de ADP unido por ATP,* resultando en la formación de monómeros de ATP/actina que pueden repolimerizar en filamentos. (B) La ADF/cofilina también se une y escinde filamentos de actina, creando nuevos extremos.

su ensamblaje en filamentos. Algunas proteínas de formina agilizan en mayor medida la polimerización de los filamentos al unirse a la profilina mientras permanecen unidos a los monómeros de actina/ATP.

Como cabría esperar, las actividades de la cofilina, profilina y el complejo Arp2/3 están controlados por una variedad de mecanismos señalizadores celulares (estudiados en el Cap. 15), que permiten que la polimerización de actina se regule apropiadamente en respuesta a estímulos ambientales. Así, la ADF/cofilina, la profilina y el complejo Arp2/3 (además de otras proteínas de unión a actina) pueden actuar conjuntamente para estimular la renovación de los filamentos de actina y la remodelación del citoesqueleto de actina, lo que es necesario para una diversidad de movimientos celulares y cambios en la forma de la célula como se describe más adelante en este capítulo. Esto es una gran tarea y, en algunos tipos celulares, el ensamblaje y desensamblaje de los microfilamentos es responsable de la mitad de la hidrólisis de ATP en la célula.

Muchas de las proteínas relacionadas con la actina (Arp4-8) y la propia actina se localiza, igualmente, en el núcleo. Las proteínas relacionadas con la actina están implicadas en la remodelación de la cromatina tanto en plantas como en animales y pueden participar en el ensamblaje del núcleo después de la división celular.

Organización de los filamentos de actina

Los filamentos individuales de actina se ensamblan en dos tipos generales de estructuras, denominadas **haces de actina** y **redes de actina**, que desempeñan papeles distintos en la célula (Fig. 12.9). En los haces, los filamentos de actina se unen por puentes cruzados y se disponen en estructuras para-

lelas estrechamente agrupadas. En las redes, los filamentos de actina se unen por puentes cruzados con una disposición ortogonal más holgada, y forman mallas tridimensionales con las propiedades de los geles semisólidos. La formación de estas estructuras está dirigida por varias proteínas de unión a la actina que entrelazan los filamentos de actina de maneras distintas (véase Tabla 12.1).

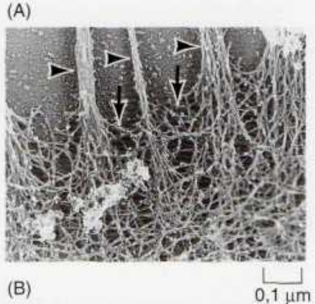
Todas las proteínas de unión a la actina relacionadas con los puentes cruzados contienen al menos dos dominios de unión a la actina, lo que les permite fijar y entrecruzar dos filamentos de actina diferentes. La naturaleza de la asociación entre estos filamentos viene entonces determinada por el tamaño y la forma de las proteínas de entrecruzamiento (véase Fig. 12.9). Las proteínas que entrelazan los filamentos de actina en haces (llamadas **proteínas formadoras de haces de actina**) suelen ser pequeñas proteínas rígidas que fuerzan a los filamentos a alinearse estrechamente unos con otros. Por otro lado, las proteínas que organizan los filamentos de actina en redes tienden a ser proteínas largas y flexibles que pueden establecer puentes de unión entre filamentos perpendiculares. Estas proteínas formadoras de puentes entrecruzados de actina parecen ser proteínas modulares constituidas por unidades estructurales relacionadas. Concretamente, los dominios de unión a la actina de muchas de estas proteínas tienen una estructura similar. Están separados por dominios reguladores y secuencias espaciadoras que varían en longitud y flexibilidad, y son estas diferencias en las secuencias espaciadoras las responsables de las distintas propiedades de entrecruzamiento de las diferentes proteínas de unión a la actina.

Existen dos tipos de haces de actina distintos tanto estructural como funcionalmente, que implican a diferentes proteínas formadoras de haces de actina (Fig. 12.10). El primer tipo de haz, que contiene filamentos de actina estrechamente agrupados, alineados en paralelo, sostiene a las proyecciones de la membrana plasmática tales como las microvellosidades (véanse Figs. 12.18 y 12.19). En estos haces todos los filamentos tienen la misma polaridad, con sus extremos protuberantes adyacentes a la membrana plasmática. Un ejemplo de proteína formadora de haces, relacionada con la formación de estas estructuras es la **fimbrina**, que fue aislada por primera vez a partir de las microvellosidades intestinales, y más tarde se encontró en las proyecciones de superficie de una amplia variedad de tipos de células. La fimbrina es una proteína de 68 kDa que contiene dos dominios adyacentes de unión a la actina. Se une a los filamentos de actina en forma de monómero, manteniendo unidos a dos filamentos paralelos.

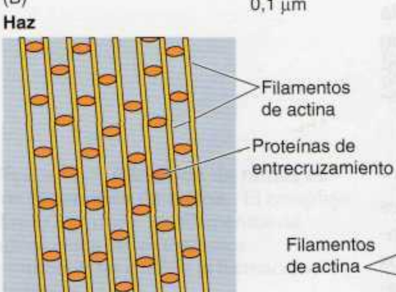
El segundo tipo de haz de actina se compone de filamentos que están más espaciados y que son capaces de contraerse, tales como los haces de actina del anillo contráctil que divide a las células en dos tras la mitosis. La estructura más holgada de estos haces (que se denominan **haces contráctiles**) refleja las propiedades de la proteína de entrecruzamiento **α-actinina**. A diferencia de la fimbrina, la α-actinina se une a la actina como un dímero,

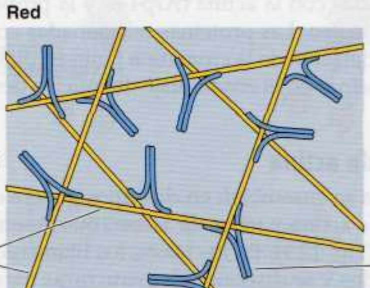
Figura 12.9 Haces y redes de actina. (A) Micrografía electrónica de haces de actina (cabezas de flecha) proyectándose desde la red de actina (flechas) subyacente a la membrana plasmática de un macrófago. Los haces sostienen unas proyecciones de la superficie celular llamadas micropúas o filopodios (véase Fig. 12.20). (B) Organización esquemática de los haces y las redes. Los filamentos de actina en los haces se disponen en formaciones paralelas unidos por puentes cruzados por proteínas pequeñas que alinean los filamentos estrechamente unos con otros. Por el contrario, las redes se encuentran formadas por proteínas grandes y flexibles que entrelazan filamentos ortogonales. (A, cortesía de John H. Hartwig, Brigham & Women's Hospital.)

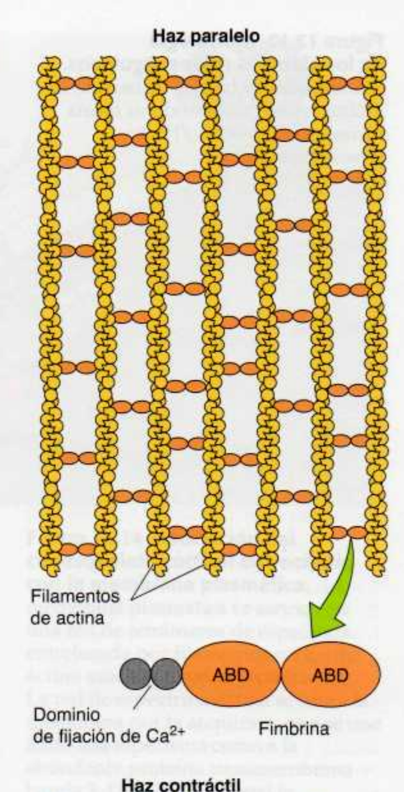
(A)



(B)







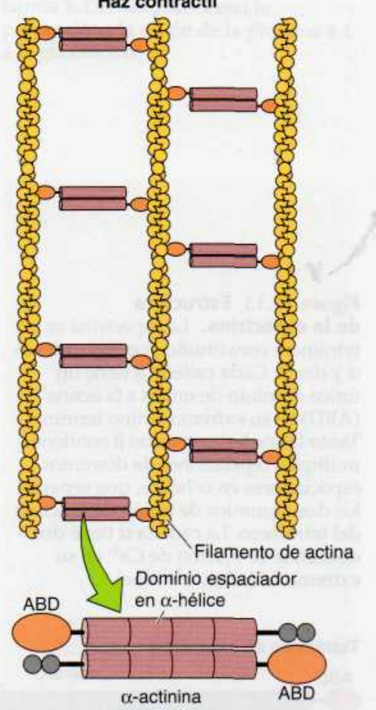


Figura 12.10 Proteínas formadoras de haces de actina. Los filamentos de actina se asocian en dos tipos de haces mediante diferentes proteínas formadoras de haces de actina. La fimbrina tiene dos dominios de unión a la actina adyacentes (ABD) y entrelaza filamentos de actina en haces paralelos, estrechamente empaquetados, en los que los filamentos se encuentran separados aproximadamente 14 nm. Por otro lado, los dos dominios de unión a actina separados de los dímeros de α-actinina entrelazan los filamentos en haces contráctiles más holgados y espaciados, en los que los filamentos se encuentran separados 40 nm. Tanto la fimbrina como la α-actinina contienen dos dominios de fijación de Ca^{2+} relacionados, y la α-actinina contiene cuatro dominios espaciadores en α-hélice repetidos.

siendo cada una de las subunidades una proteína de 102 kDa que contiene un único sitio de unión a la actina. Por tanto, los filamentos entrelazados por la α-actinina se encuentran separados por una distancia mucho mayor que aquellos unidos por la fimbrina (40 nm de separación frente a 14 nm). La mayor separación entre los filamentos permite a la proteína motora miosina interaccionar con los filamentos de actina en estos haces, permitiendo (como se verá más adelante) su contracción.

En las redes los filamentos de actina se mantienen unidos mediante proteínas de unión a la actina de gran tamaño, como la **filamina** (Fig. 12.11). La filamina se fija a la actina como un dímero de dos subunidades de 280 kDa. Los dominios de unión a la actina y los dominios de dimerización se encuentran en extremos opuestos de cada subunidad, por lo que el dímero de filamina es una molécula flexible en forma de V con los dominios de unión a la actina en los extremos de cada brazo. Como resultado, la filamina forma puentes cruzados entre filamentos de actina ortogonales, creando una malla tridimensional holgada. Tal y como se tratará en la próxima sección, dicha red de filamentos de actina subyace a la membrana plasmática y es un soporte estructural de la superficie de la célula.

Asociación de los filamentos de actina con la membrana plasmática

En la periferia de la célula hay una elevada concentración de filamentos de actina que forman una red tridimensional bajo la membrana plasmática (véase Fig. 12.9). Esta red de filamentos de actina y de proteínas de unión a la actina asociadas (denominada el **córtex celular**) determina la forma de la

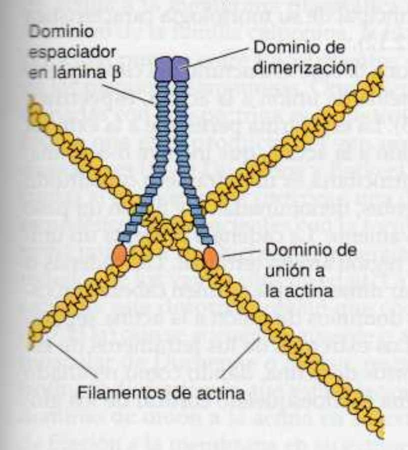


Figura 12.11 Redes de actina y la filamina. La filamina es un dímero de dos subunidades grandes (280 kDa), que forman una molécula flexible en forma de V y que entrelaza los filamentos de actina en redes ortogonales. El dominio de dimerización carboxilo-terminal se encuentra separado del dominio de unión a la actina amino-terminal por dominios espaciadores en lámina β repetidos.

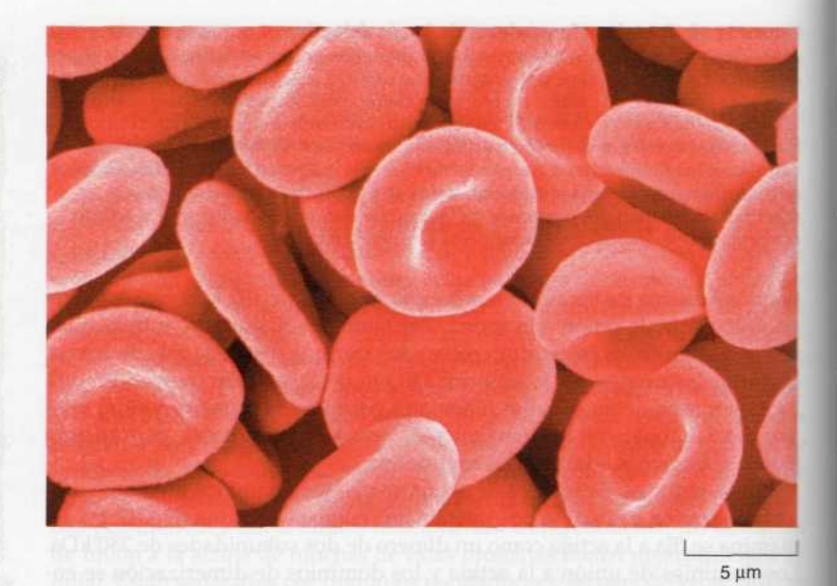


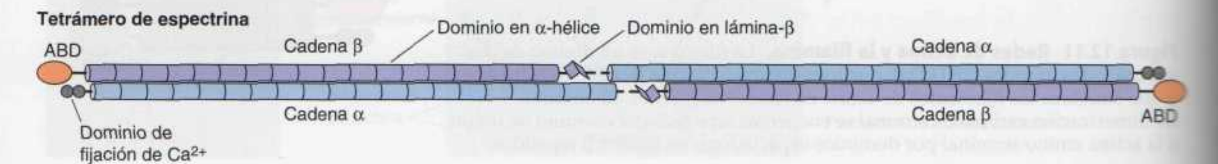
Figura 12.12 Morfología de los glóbulos rojos sanguíneos. Micrografía electrónica de barrido de glóbulos rojos mostrando su forma bicóncava. (Omikron/Photo Researchers, Inc.)

célula y está implicada en diversas acciones de la superficie celular, incluyendo el movimiento. De esta manera, la asociación del citoesqueleto de actina con la membrana plasmática es fundamental para la estructura y la función celular.

Los glóbulos rojos sanguíneos (eritrocitos) han demostrado ser particularmente útiles para el estudio tanto de la membrana plasmática (que se tratará en el próximo capítulo) como del citoesqueleto cortical. La principal ventaja de los glóbulos rojos para estos estudios radica en que no contienen ni núcleo ni orgánulos internos, por lo que la membrana plasmática y las proteínas asociadas pueden ser aisladas fácilmente sin ser contaminadas por las diferentes membranas internas que son abundantes en otros tipos de células. Además, los eritrocitos humanos carecen de otros componentes citoesqueléticos (microtúbulos o filamentos intermedios), por lo que el citoesqueleto cortical es el determinante principal de su morfología característica en forma de discos bicóncavos (Fig. 12.12).

La principal proteína que proporciona la base estructural del citoesqueleto cortical en los eritrocitos es la proteína de unión a la actina, **espectrina**, relacionada con la filamina (Fig. 12.13). La espectrina pertenece a la extensa familia calponina de proteínas de unión a la actina, que incluye α-actinina, filamina y fimbrina. La espectrina eritrocitaria es un tetrámero constituido por dos cadenas polipeptídicas diferentes, denominadas α y β, con un peso molecular de 240 y 220 kDa, respectivamente. La cadena β presenta un único dominio de unión a la actina en la región amino terminal. Las cadenas α y β se asocian lateralmente para formar dímeros, que se unen cabeza con cabeza para formar tetrámeros con dos dominios de unión a la actina separados aproximadamente por 200 nm. Los extremos de los tetrámeros de espectrina se asocian con filamentos cortos de actina, dando como resultado una red de espectrina-actina que forma el citoesqueleto cortical de los gló-

Figura 12.13 Estructura de la espectrina. La espectrina es un tetrámero constituido por dos cadenas α y dos β. Cada cadena β tiene un único dominio de unión a la actina (ABD) en su extremo amino terminal. Tanto las cadenas α como β contienen múltiples repeticiones de dominios espaciadores en α-hélice, que separan los dos dominios de unión de la actina del tetrámero. La cadena α tiene dos dominios de fijación de Ca^{2+} en su extremo carboxilo terminal.



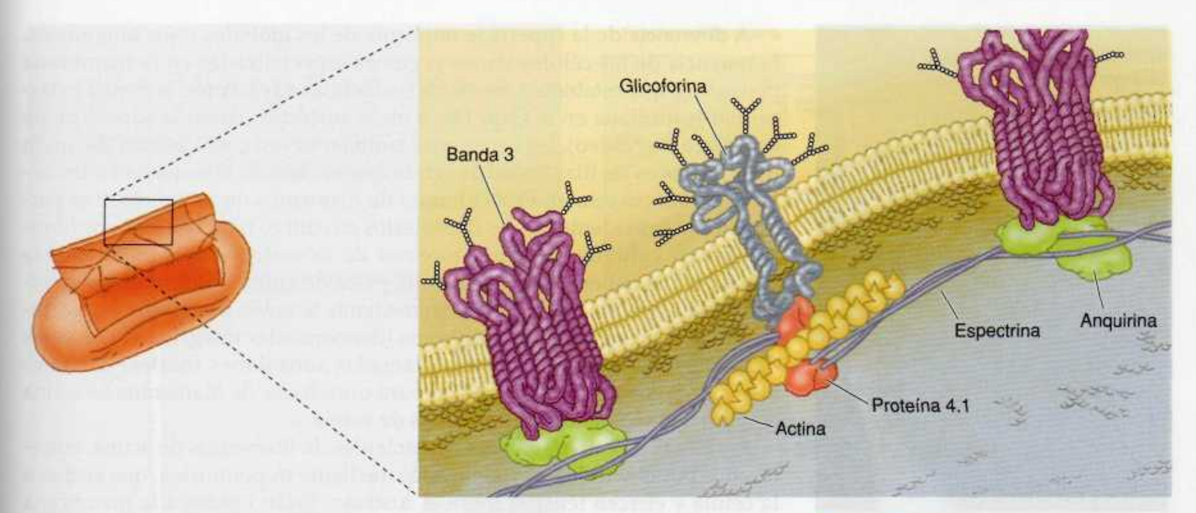


Figura 12.14 Asociación del citoesqueleto cortical eritrocitario con la membrana plasmática. La membrana plasmática se asocia con una red de tetrámeros de espectrina entrelazada por filamentos cortos de actina asociados con la proteína 4.1. La red de espectrina-actina se une a la membrana por la anquirina, que se une tanto a la espectrina como a la abundante proteína transmembrana banda 3. Un nexo adicional lo proporciona la unión de la proteína 4.1 a la glicoforina.

bulos rojos (Fig. 12.14). El principal nexo de unión entre la red de espectrina-actina y la membrana plasmática lo proporciona la proteína denominada **anquirina**, que se une tanto a la espectrina como al dominio citoplasmático de una proteína transmembrana abundante denominada banda 3. Un nexo adicional entre la red de espectrina-actina y la membrana plasmática viene dado por la proteína 4.1, que se fija a las uniones de espectrina-actina así como reconoce el dominio citoplasmático de la glicoforina (otra proteína transmembrana abundante).

Otros tipos de células contienen uniones entre el citoesqueleto cortical y la membrana plasmática que son similares a las observadas en los glóbulos rojos. Las proteínas relacionadas con la espectrina (la espectrina no-eritroide también se denomina **fodrina**), la anquirina y la proteína 4.1 se expresan en una gran variedad de tipos celulares, donde realizan funciones análogas a aquellas descritas para los eritrocitos. Por ejemplo, una familia de proteínas relacionada con la proteína 4.1 (las **proteínas ERM**) unen los filamentos de actina a la membrana plasmática de muchas clases de células, y otro miembro de la familia calponina, la filamina (véase Fig. 12.11) constituye el principal puente entre los filamentos de actina y la membrana plasmática de las plaquetas sanguíneas. Otro miembro de este grupo de proteínas relacionadas con la espectrina es la **distrofina**, que tiene un interés especial debido a que es el producto del gen responsable de dos tipos de distrofias musculares (la de Duchenne y Becker). Estas enfermedades congénitas asociadas al cromosoma X provocan una degeneración progresiva del músculo esquelético, y los pacientes con la forma más severa de la enfermedad (distrofia muscular de Duchenne) generalmente mueren en la adolescencia o alrededor de los veinte años de edad. La clonación molecular del gen responsable de este desorden reveló que codifica una proteína de gran tamaño (427 kDa) que se encuentra ausente o alterada en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne o Becker, respectivamente. La secuencia de la distrofina indicó además que está relacionada con la espectrina, con un único dominio de unión a la actina en su extremo amino terminal y un dominio de fijación a la membrana en su extremo carboxilo terminal. Al igual que la espectrina, la distrofina forma dímeros que fijan los filamentos de actina a las proteínas transmembrana de la membrana plasmática de la célula muscular. Estas proteínas transmembrana a su vez fijan el citoesqueleto a la matriz extracelular, lo que desempeña un papel importante en mantener la es[illegible]dad celular duran[illegible]e la contracción muscular.



Figura 12.15 Fibras de estrés y adhesiones focales. Microscopia de fluorescencia de un fibroblasto humano en el que los filamentos de actina se han teñido con un marcador fluorescente. Las fibras de estrés se muestran como haces de filamentos de actina anclados a sitios donde la célula se une a la superficie de la placa de cultivo (adhesiones focales). (Don Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

A diferencia de la superficie uniforme de los glóbulos rojos sanguíneos, la mayoría de las células tienen regiones especializadas en la membrana plasmática que establecen contactos con células adyacentes, la matriz extracelular (estudiada en el Cap. 14), u otros sustratos (como la superficie de una placa de cultivo). Estas regiones también sirven como puntos de unión para los haces de filamentos de actina que anclan el citoesqueleto a las zonas de contacto celular. Estas uniones de filamentos de actina resultan particularmente evidentes en los fibroblastos en cultivo (Fig. 12.15). Estos fibroblastos en cultivo segregan proteínas de la matriz extracelular que se adhieren a la superficie plástica de la placa de cultivo. Entonces los fibroblastos se unen a la placa de cultivo mediante la unión a la matriz extracelular de unas proteínas transmembrana (denominadas **integrinas**). Los sitios de anclaje son regiones discretas (llamadas **adhesiones focales**) que también sirven como sitios de sujeción para unos haces de filamentos de actina de gran tamaño denominados **fibras de estrés**.

Las fibras de estrés son haces contráctiles de filamentos de actina, entrelazados por α-actinina y estabilizados mediante tropomiosina, que anclan a la célula y ejercen tensión sobre el sustrato. Están unidas a la membrana plasmática en las adhesiones focales a través de la integrina. Estas asociaciones, que son complejas y no bien entendidas, pueden estar mediadas por otras proteínas, incluyendo la **talina** y la **vinculina** (Fig. 12.16). Por ejemplo, tanto la talina como la α-actinina se unen a los dominios citoplasmáticos de las integrinas. La talina también se une a la vinculina, que a su vez se une a la actina. Otras proteínas encontradas en las adhesiones focales también pueden participar en el anclaje de los filamentos de actina, y una combinación de estas interacciones puede ser la responsable de la unión de los filamentos de actina a la membrana plasmática.

El citoesqueleto de actina se encuentra anclado de forma similar a regiones de contacto célula-célula denominadas **uniones de adherencia** (Fig. 12.17). En las capas de células epiteliales estas uniones forman una estructura continua en forma de cinturón (denominada **cinturón de adhesión**) alrededor de cada célula, de tal manera que un haz contráctil de filamentos de actina subyacente se une a la membrana plasmática. El contacto entre las células en las uniones de adherencia está mediado por proteínas transmembrana llamadas **cadherinas**, que serán tratadas en el Capítulo 14. Las cadherinas forman un complejo con las proteínas citoplasmáticas denominadas **cateninas**, que anclan los filamentos de actina en la membrana plasmática.

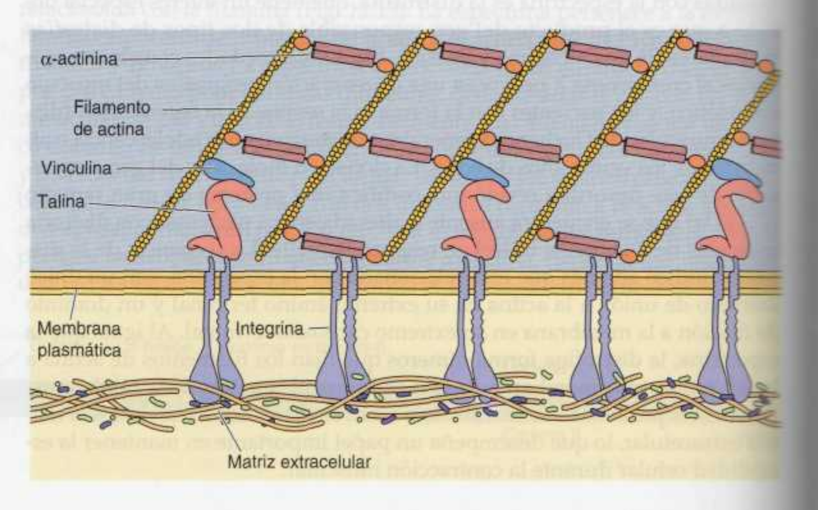


Figura 12.16 Anclaje de las fibras de estrés a la membrana plasmática en las adhesiones focales. Las adhesiones focales están mediadas por la unión de las integrinas a proteínas de la matriz extracelular. Las fibras de estrés (haces de filamentos de actina entrelazados por α-actinina) se unen al dominio citoplasmático de las integrinas mediante asociaciones complejas en las que intervienen un cierto número de proteínas. Se muestran dos posibles asociaciones: 1) La talina se une a la integrina y a la vinculina, que a su vez se une a la actina, y 2) la integrina se une a la α-actinina. En las adhesiones focales también se encuentran presentes otras proteínas (que no se representan) y que pueden estar implicadas en el anclaje de las fibras de estrés a la membrana plasmática.

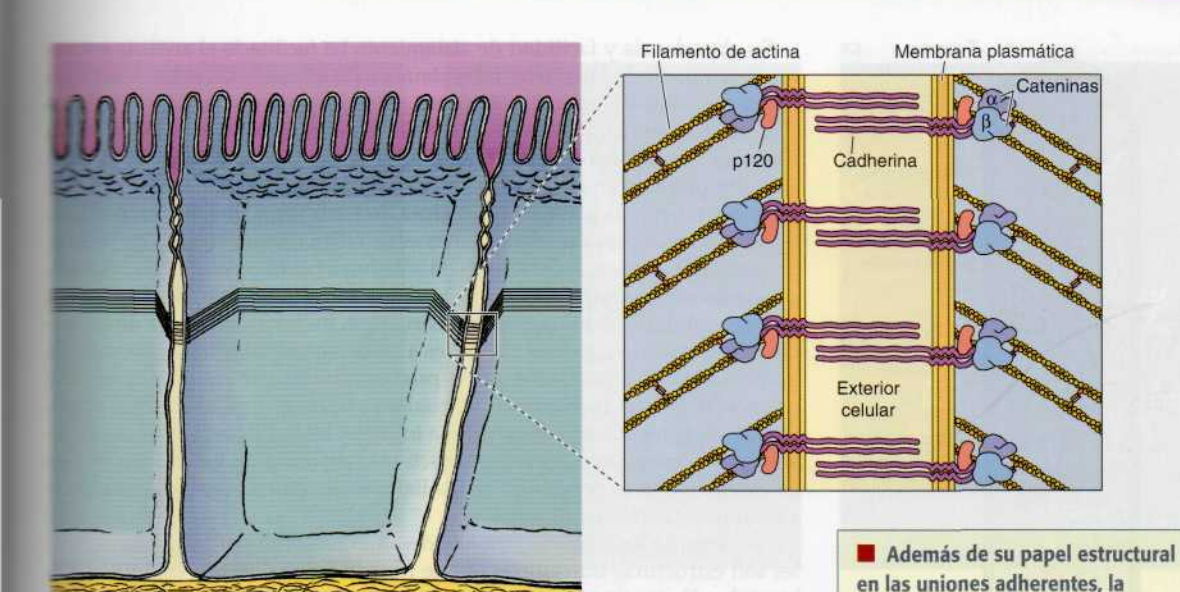


Figura 12.17 Anclaje de los filamentos de actina a las uniones de adherencia. Los contactos célula-célula en las uniones de adherencia están mediados por cadherinas, que sirven como sitios de unión de los haces de actina. En las capas de células epiteliales estas uniones forman un cinturón continuo de filamentos de actina alrededor de cada célula. Las cadherinas son proteínas transmembrana que unen β-catenina y p120, que regula la estabilidad de la unión. De igual modo, β-catenina se une a α-catenina, un proceso que parece intervenir en la asociación de filamentos de actina con las uniones de adherencia a través de la regulación de su ensamblaje y organización.

■ Además de su papel estructural en las uniones adherentes, la β-catenina es un componente crítico de la vía de señalización Wnt donde funciona como un activador de la transcripción (véase Cap. 15).

Protuberancias de la superficie celular

La superficie de la mayoría de las células tiene diversas protuberancias o extensiones que intervienen en el movimiento celular, la fagocitosis, o en funciones especializadas tales como la absorción de los nutrientes. La mayoría de estas extensiones celulares superficiales se basan en filamentos de actina, que están organizados en haces o redes relativamente estables o que se reorganizan rápidamente.

Las protuberancias de la superficie celular basadas en la actina mejor caracterizadas son las **microvellosidades**, extensiones digitiformes de la membrana plasmática que son particularmente abundantes en la superficie de las células implicadas en la absorción, como las células epiteliales que tapizan el intestino (Fig. 12.18). Las microvellosidades de estas células forman una capa sobre la superficie apical (denominada **borde en cepillo**) que consta aproximadamente de un millar de microvellosidades por célula y que aumenta de 10 a 20 veces la superficie útil para la absorción. Además de su papel en la absorción, unas formas especializadas de microvellosidades, los **esterocilios** de las células auditivas, son las responsables de la audición mediante la detección de las vibraciones sonoras.

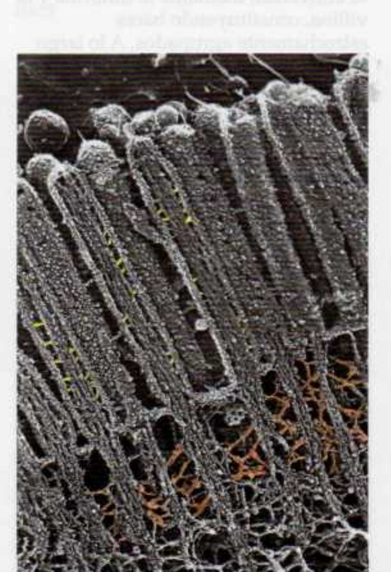


Figura 12.18 Micrografía electrónica de microvellosidades. Las microvellosidades de las células epiteliales intestinales son proyecciones digitiformes de la membrana plasmática. Se sostienen mediante haces de actina anclados en una densa región del córtex llamada la red terminal. (Cortesía de Nobutaka Hirokawa.)

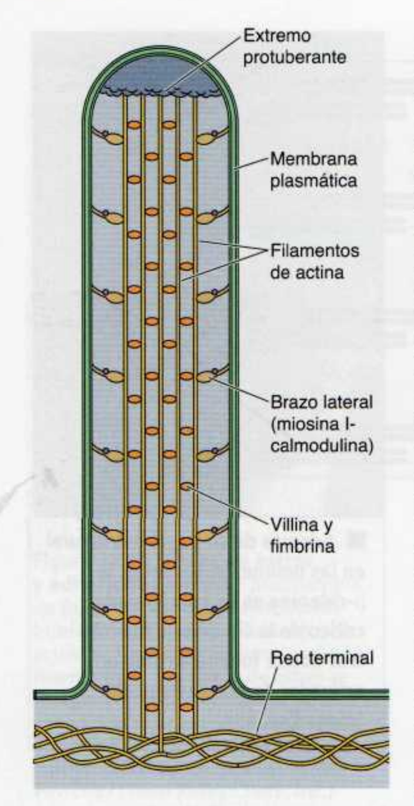


Figura 12.19 Organización de las microvellosidades. Los filamentos de actina centrales de las microvellosidades se entrelazan mediante la fimbrina y la villina, constituyendo haces estrechamente agrupados. A lo largo de su estructura se unen a la membrana plasmática a través de brazos laterales, constituidos por miosina I y calmodulina. Los extremos protuberantes de los filamentos de actina están embebidos en una cápsula de proteínas no identificadas en la punta de la microvellosidad.

Su abundancia y facilidad de aislamiento ha facilitado el análisis estructural detallado de las microvellosidades intestinales, las cuales contienen haces paralelos de 20 a 30 filamentos de actina estrechamente agrupados (Fig. 12.19). Los filamentos en estos haces están entrelazados en parte por la fimbrina, una proteína formadora de haces de actina (vista anteriormente) que está presente en las proyecciones superficiales de varios tipos de células. Sin embargo, la proteína formadora de haces de actina más importante en las microvellosidades intestinales es la **villina**, una proteína de 95 kDa presente en las microvellosidades de sólo unos pocos tipos de células especializadas, como las que tapizan el intestino y los túbulos renales y las de las uniones celulares. A lo largo de su estructura, los haces de actina de las microvellosidades se encuentran unidos a la membrana plasmática a través de brazos laterales constituidos por la proteína fijadora de calcio calmodulina en asociación con la miosina I, la cual puede estar implicada en el movimiento de la membrana plasmática a lo largo del haz de actina de la microvellosidad. En su base, los haces de actina están anclados en una región rica en espectrina de la corteza de actina llamada la red terminal, que entrelaza y estabiliza las microvellosidades.

A diferencia de las microvellosidades, muchas protuberancias superficiales son estructuras transitorias que se forman en respuesta a estímulos ambientales. Varios tipos de estas estructuras se extienden desde la parte anterior de la célula en movimiento y están implicados en la locomoción celular (Fig. 12.20). Los **pseudópodos** son extensiones de un ancho moderado, basados en filamentos de actina entrelazados en una red tridimensional, que son responsables de la fagocitosis y del movimiento de las amebas sobre una superficie. Los **lamelipodios** son extensiones anchas, laminares, del borde apical de los fibroblastos, que de forma similar contienen una red de filamentos de actina. Muchas células también extienden **microespinas** o **filopodios**, proyecciones delgadas de la membrana plasmática sustentadas por haces de actina. La formación y retracción de estas estructuras se basa en el ensamblaje y desensamblaje regulado de los filamentos de actina, como se analiza más adelante en este capítulo.

Actina, miosina y movimiento celular

Los filamentos de actina, generalmente asociados con la **miosina**, son los responsables de muchos tipos de movimientos celulares. La miosina es el prototipo de **motor molecular** —una proteína que convierte energía química en forma de ATP en energía mecánica, generando de esta manera fuerza y movimiento—. El tipo de movimiento más sorprendente es la contracción muscular, que ha proporcionado el modelo para comprender las interacciones actina-miosina y la actividad motora de las moléculas de miosina. Sin embargo, las interacciones entre la actina y la miosina son las responsables no sólo de la contracción muscular sino también de diversos tipos de movimientos de las células no musculares, incluyendo la división celular, por lo que estas interacciones desempeñan un papel central en la biología celular.

Contracción muscular

Las células musculares están altamente especializadas en una única tarea, la contracción, y es esta especialización en su estructura y función lo que convierte al músculo en el prototipo para el estudio del movimiento a nivel molecular y celular. Existen tres tipos distintos de células musculares en los vertebrados: músculo esquelético, responsable de todos los movimientos voluntarios; músculo cardíaco, que bombea la sangre desde el corazón; y músculo liso, responsable de los movimientos involuntarios de órganos tales como el estómago, intestino, útero y vasos sanguíneos. Tanto en el







Figura 12.20 Ejemplos de proyecciones celulares superficiales implicadas en la fagocitosis y el movimiento. (A) Micrografía electrónica de barrido mostrando pseudópodos de un macrófago engullendo una célula tumoral durante la fagocitosis. (B) Ameba con varios pseudópodos extendidos. (C) Célula de cultivo tisular mostrando lamelipodios (L) y filopodios (flecha). (A, K. Wassermann/Visuals Unlimited; B, Stanley Flegler/Visuals Unlimited; C, Don Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

músculo esquelético como en el músculo cardíaco, los elementos contráctiles del citoesqueleto aparecen en estructuras altamente organizadas que dan lugar al patrón característico de estriaciones transversales. La caracterización de estas estructuras en el músculo esquelético es lo que nos ha permitido comprender la contracción muscular, y otros movimientos celulares basados en la actina, a nivel molecular.

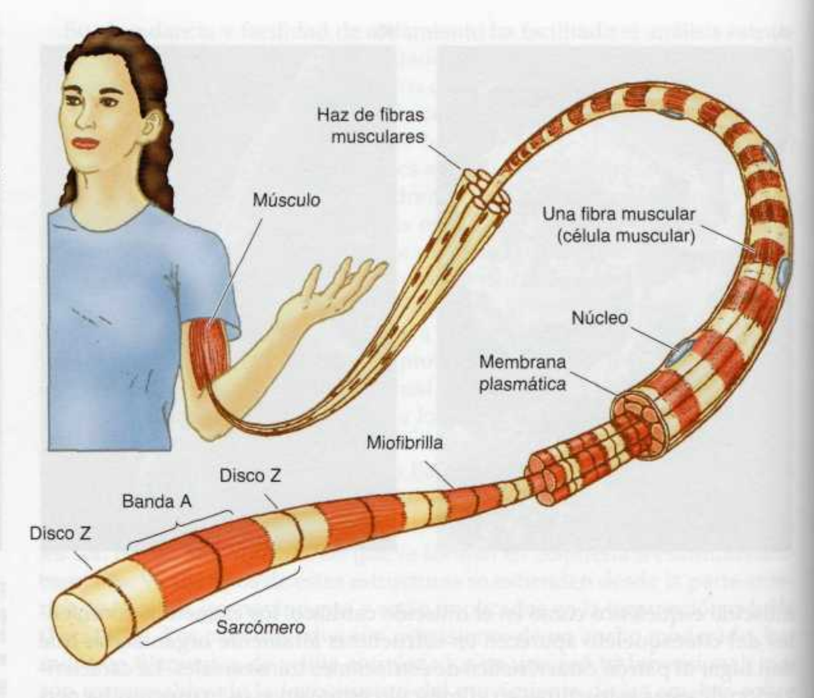
Los músculos esqueléticos son haces de **fibras musculares**, que son células individuales grandes (de aproximadamente 50 µm de diámetro y varios centímetros de longitud) formadas por la fusión de muchas células individuales durante el desarrollo (Fig. 12.21). La mayor parte del citoplasma está constituido por **miofibrillas**, que son haces cilíndricos de dos tipos de filamentos: filamentos gruesos de miosina (aproximadamente de 15 nm de diámetro) y filamentos delgados de actina (alrededor de 7 nm de diámetro). Cada miofibrilla se estructura a modo de una cadena de unidades contráctiles llamadas **sarcómeros**, que son los responsables de la apariencia estriada de los músculos cardíaco y esquelético.

Los sarcómeros (que miden aproximadamente 2,3 µm de longitud) constan de varias regiones diferenciadas, discernibles por microscopia electrónica, lo que permitió revelar el mecanismo de la contracción muscular (Fig. 12.22). Los extremos de cada sarcómero vienen delimitados por el disco Z. Dentro de cada sarcómero alternan bandas oscuras (llamadas bandas A porque son *anisótropas* cuando se observan con luz polarizada) con bandas claras (llamadas bandas I por ser *i*sótropas). Estas bandas se corresponden con la presencia o ausencia de filamentos de miosina. Las bandas I solamente contienen filamentos delgados (de actina), mientras que las bandas A contienen filamentos gruesos (de miosina). Los filamentos de miosina y actina se solapan en regiones periféricas de la banda A, mientras que una región intermedia (llamada zona H) contiene sólo miosina. Los filamentos de actina se unen por sus extremos protuberantes al disco Z, que contiene la proteína de entrecruzamiento α-actinina. Los filamentos de miosina se unen en la zona media del sarcómero, la línea M.

Otras dos proteínas (**titina** y **nebulina**) también contribuyen a la estructura y estabilidad del sarcómero (Fig. 12.23). La titina es una proteína extremadamente grande (3.000 kDa), y se extienden moléculas individuales de titina desde la línea M hasta el disco Z. Estas largas moléculas de titina se

■ **Las moléculas que regulan la actividad de las células de músculo liso son medicamentos importantes. Por ejemplo, el albuterol, un medicamento que relaja los músculos lisos, se emplea para el tratamiento de asma y para prevenir el parto prematuro en mujeres embarazadas. Por el contrario, la oxitocina, una hormona que estimula la contracción muscular, se administra para inducir el parto.**

Figura 12.21 Estructura de las células musculares. Los músculos se componen de haces de células individuales largas (llamadas fibras musculares) que se forman por fusión celular y que contienen múltiples núcleos. Cada fibra muscular contiene muchas miofibrillas, que a su vez son haces de filamentos de actina y miosina organizados en una cadena de unidades repetidas llamadas sarcómeros.



cree que actúan como muelles que mantienen los filamentos de miosina centrados en el sarcómero y mantienen la tensión de reposo que permite al músculo retraerse si se extiende en exceso. Los filamentos de nebulina están asociados con la actina y se piensa que regulan el ensamblaje de los filamentos de actina actuando como reglas que determinan su longitud.

La base para comprender la contracción muscular es el **modelo de deslizamiento de los filamentos**, propuesto por primera vez en 1954 por Andrew

(A) Banda I Banda A

0,5 μm

(B) Zona H Actina Miosina

Disco Z Línea M

Sarcómero

Figura 12.22 Estructura del sarcómero. (A) Micrografía electrónica de un sarcómero. (B) Diagrama mostrando la organización de los filamentos de actina (delgados) y miosina (gruesos) en las regiones indicadas. (A, Frank A. Pepe/Biological Photo Service.)

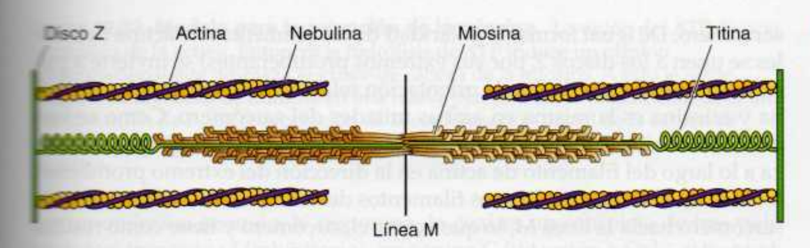


Figura 12.23 Titina y nebulina. Las moléculas de titina se extienden desde el disco Z hasta la línea M y actúan como muelles que mantienen los filamentos de miosina centrados en el sarcómero. Las moléculas de nebulina se extienden desde el disco Z y se piensa que determinan la longitud de los filamentos de actina asociados.

Huxley y Ralph Niedergerke y por Hugh Huxley y Jean Hanson (Fig. 12.24). Durante la contracción muscular, cada sarcómero se encoge, acercando los discos Z. La amplitud de la banda A no varía, pero tanto las bandas I como la zona H casi desaparecen por completo. Estos cambios se explican porque los filamentos de actina y miosina se deslizan uno sobre otro, por lo que los filamentos de actina ocupan la banda A y la zona H. Por tanto, la contracción muscular se debe a la interacción entre los filamentos de actina y miosina que genera el movimiento relativo de uno respecto al otro. La base molecular de esta interacción es la unión de la miosina a los filamentos de actina, lo que permite a la miosina funcionar como un motor que dirige el deslizamiento de los filamentos.

El tipo de miosina presente en el músculo (**miosina II**) es una proteína muy grande (aproximadamente 500 kDa) constituida por dos cadenas pesadas idénticas (alrededor de 200 kDa cada una) y dos pares de cadenas ligeras (alrededor de 20 kDa cada una) (Fig. 12.25). Cada cadena pesada consta de una cabeza globular y de una cola larga en α-hélice. Las colas en α-hélice de dos cadenas pesadas se enrollan una alrededor de la otra en una estructura de espiral enrollada (*coiled-coil*) para formar un dímero, y dos cadenas ligeras se asocian con el cuello de cada región de la cabeza para formar la molécula completa de miosina II.

Los filamentos gruesos del músculo están constituidos por varios cientos de moléculas de miosina, unidas por interacciones entre sus colas, en una disposición paralela escalonada (Fig. 12.26). Las cabezas globulares de miosina se unen a la actina, formando puentes cruzados entre los filamentos gruesos y delgados. Es importante señalar que la orientación de las moléculas de miosina de los filamentos gruesos se invierte a partir de la línea M del

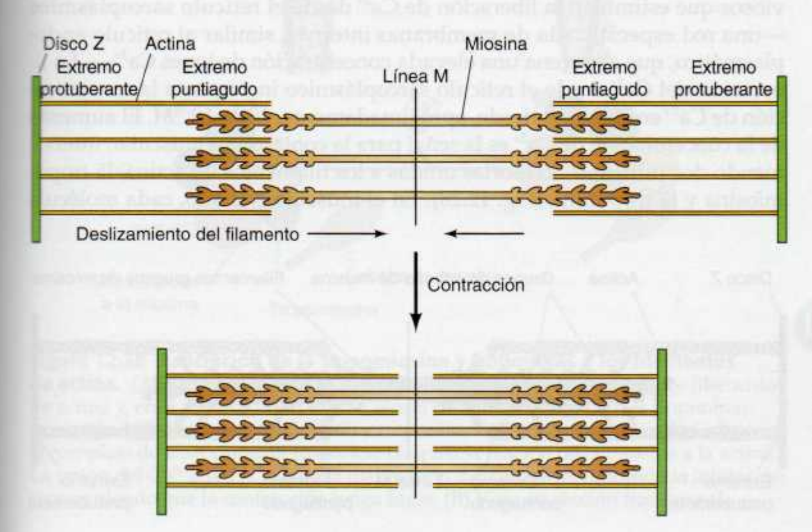


Figura 12.24 Modelo de deslizamiento de los filamentos de la contracción muscular. Los filamentos de actina se deslizan sobre los filamentos de miosina hacia la zona media del sarcómero. El resultado es el acortamiento del sarcómero sin ningún cambio en la longitud de los filamentos.

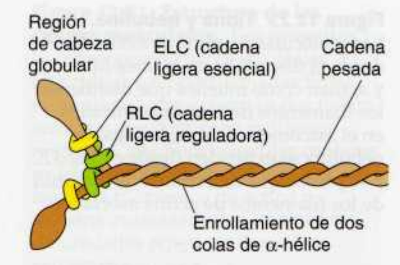


Figura 12.25 Miosina II. La molécula de miosina II consta de dos cadenas pesadas y dos pares de cadenas ligeras (denominadas cadenas ligeras esenciales y reguladoras). Las cadenas pesadas tienen regiones de cabeza globular y colas largas en α-hélice, que se enrollan una alrededor de la otra para formar dímeros.

sarcómero. De igual forma, la polaridad de los filamentos de actina (los cuales se unen a los discos Z por sus extremos protuberantes) se invierte a partir de la línea M, por lo que la orientación relativa de los filamentos de actina y miosina es la misma en ambas mitades del sarcómero. Como se verá más adelante, la actividad motora de la miosina mueve sus grupos de cabeza a lo largo del filamento de actina en la dirección del extremo protuberante. Este movimiento desliza los filamentos de actina desde ambos lados del sarcómero hacia la línea M, lo que acorta el sarcómero y tiene como resultado la contracción muscular.

Además de unirse a la actina, las cabezas de miosina fijan e hidrolizan ATP, el cual proporciona la energía para dirigir el deslizamiento de los filamentos. Esta transformación de energía química en movimiento se realiza mediante cambios en la forma de la miosina debidos a la unión del ATP. El modelo comúnmente aceptado (el modelo de vaivén o balanceo del puente cruzado) es que la hidrólisis de ATP provoca repetidos ciclos de interacción entre las cabezas de miosina y la actina. Durante cada ciclo, los cambios conformacionales en la miosina conducen al movimiento de las cabezas de miosina a lo largo de los filamentos de actina.

Aunque los mecanismos moleculares no están todavía completamente dilucidados, se ha proporcionado un modelo plausible de la actividad de la miosina a partir de estudios *in vitro* del movimiento de la miosina a lo largo de filamentos de actina (un sistema desarrollado por James Spudich y Michael Sheetz) y a partir de la determinación de la estructura tridimensional de la miosina por Ivan Rayment y sus colaboradores (Fig. 12.27). El ciclo comienza con la miosina (en ausencia de ATP) unida fuertemente a la actina. La unión de ATP disocia el complejo miosina-actina y la hidrólisis del ATP induce un cambio conformacional en la miosina. Este cambio afecta a la región del cuello de la miosina que une las cadenas ligeras (véase Fig. 12.25), que actúa como un brazo de palanca desplazando la cabeza de miosina aproximadamente 5 nm. Los productos de la hidrólisis (ADP y P_i) permanecen unidos a la cabeza de miosina, diciéndose que está en posición «ladeada». La cabeza de miosina se vuelve a unir al filamento de actina en una nueva posición, produciéndose la liberación de P_i, lo que induce el «golpe de potencia», a través del cual se libera ADP y la cabeza de miosina adopta de nuevo su conformación inicial, de modo que los filamentos de actina se deslizan hacia la línea M del sarcómero.

La contracción del músculo esquelético es disparada por impulsos nerviosos que estimulan la liberación de Ca^{2+} desde el **retículo sarcoplásmico** —una red especializada de membranas internas, similar al retículo endoplasmático, que almacena una elevada concentración de iones Ca^{2+}—. La liberación del Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico incrementa la concentración de Ca^{2+} en el citosol desde, aproximadamente, 10^{-7} a 10^{-5} *M*. El aumento de la concentración de Ca^{2+} es la señal para la contracción muscular, interviniendo dos proteínas accesorias unidas a los filamentos de actina: la tropomiosina y la **troponina** (Fig. 12.28). En el músculo estriado, cada molécula

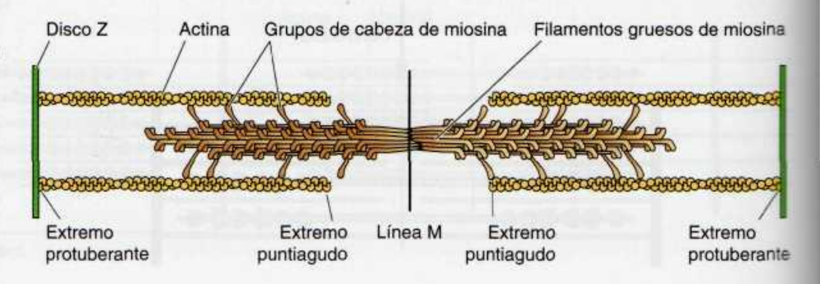
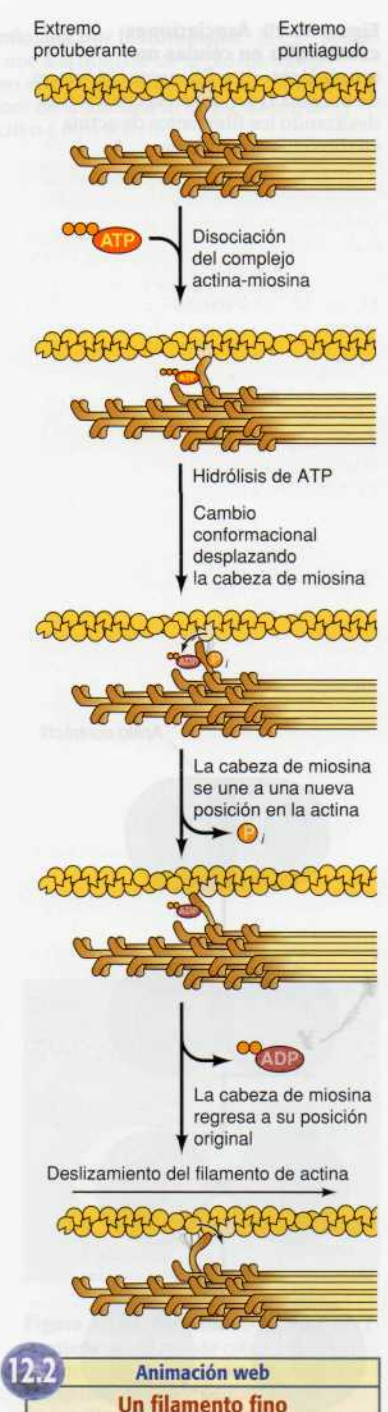


Figura 12.26 Organización de los filamentos gruesos de miosina. Los filamentos gruesos están constituidos por la asociación de varios cientos de moléculas de miosina II en una formación escalonada. Las cabezas globulares de la miosina se unen a la actina, formando puentes cruzados entre los filamentos de miosina y de actina. La orientación de los filamentos de actina y miosina se invierte a partir de la línea M, por lo que su polaridad relativa es igual en ambos lados del sarcómero.

Figura 12.27 Modelo para la actuación de la miosina. La unión del ATP disocia la miosina de la actina. Entonces la hidrólisis de ATP induce un cambio conformacional que desplaza al grupo de cabeza de la miosina. A esto le sigue la unión de la cabeza de miosina en una nueva posición sobre el filamento de actina y la liberación de P_i. La recuperación de la conformación inicial de la cabeza de miosina, junto a la liberación de ADP, induce el deslizamiento de los filamentos de actina.



de tropomiosina se une a la troponina, la cual es un complejo de tres polipéptidos: troponina I (inhibitorio), troponina C (de unión a Ca^{2+}), y troponina T (de unión a la tropomiosina). Cuando la concentración de Ca^{2+} es baja, el complejo de las troponinas con la tropomiosina bloquea la interacción de casi todas las actinas con los grupos de las cabezas de miosina, por lo que el músculo no se contrae. A altas concentraciones, la unión del Ca^{2+} a la troponina C altera la disposición del complejo, permitiendo el acceso a las cabezas de miosina e incrementando el número de actinas y permitiendo que proceda la contracción.

Asociaciones contráctiles de actina y miosina en células no musculares

En las células no musculares también están presentes asociaciones contráctiles de actina y miosina, similares a versiones a pequeña escala de las fibras

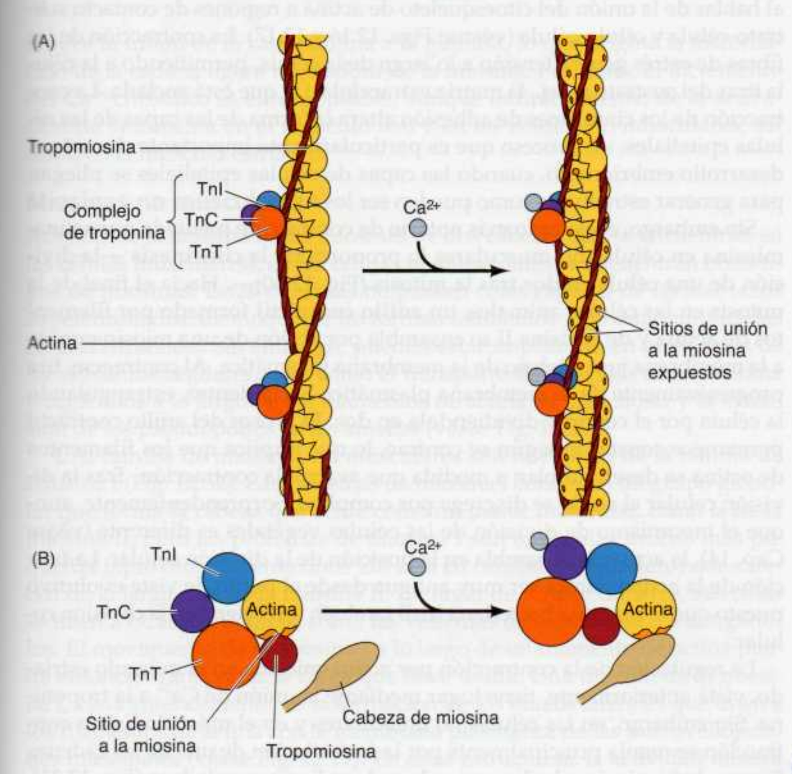


Figura 12.28 Asociación de la tropomiosina y troponinas a los filamentos de actina. (A) La tropomiosina se une longitudinalmente a lo largo de los filamentos de actina y, en el músculo estriado, se asocia con un complejo de tres troponinas: troponina I (TnI), troponina C (TnC) y troponina T (TnT). En ausencia de Ca^{2+}, el complejo de tropomiosina-troponina bloquea la fijación de la miosina a la actina. La unión del Ca^{2+} a la TnC altera la disposición del complejo, retirando la inhibición y permitiendo que la contracción tenga lugar. (B) Vista en sección transversal.

12.2 Animación web

Un filamento fino

Los filamentos finos del músculo esquelético consisten en filamentos de actina decorados con complejos de tropomiosina-troponina que cubren los sitios de unión a miosina.

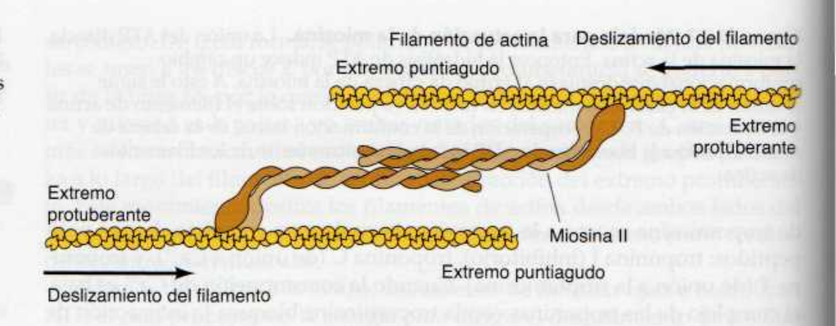


Figura 12.29 Asociaciones contráctiles en células no musculares. Los filamentos bipolares de miosina II producen la contracción deslizando los filamentos de actina en direcciones opuestas.

musculares. Al igual que en el músculo, los filamentos de actina en estos ensamblajes contráctiles están intercalados con filamentos bipolares de miosina II, constituidos por 15 a 20 moléculas de miosina II, los cuales producen la contracción deslizando los filamentos de actina uno sobre otro (Fig. 12.29). Los filamentos de actina en los haces contráctiles de las células no musculares también están asociados a la tropomiosina, que facilita su interacción con la miosina II.

Dos ejemplos de asociaciones contráctiles en células no musculares, las fibras de estrés y los cinturones de adhesión, fueron tratados anteriormente al hablar de la unión del citoesqueleto de actina a regiones de contacto sustrato-célula y célula-célula (véanse Figs. 12.16 y 12.17). La contracción de las fibras de estrés genera tensión a lo largo de la célula, permitiendo a la célula tirar del sustrato (p. ej., la matriz extracelular) al que está anclada. La contracción de los cinturones de adhesión altera la forma de las capas de las células epiteliales: un proceso que es particularmente importante durante el desarrollo embrionario, cuando las capas de células epiteliales se pliegan para generar estructuras como pueden ser los tubos.

Sin embargo, el ejemplo más notorio de contracción mediada por actina-miosina en células no-musculares lo proporciona la **citocinesis** —la división de una célula en dos tras la mitosis (Fig. 12.30)—. Hacia el final de la mitosis en las células animales, un **anillo contráctil** formado por filamentos de actina y de miosina II se ensambla por acción de una miosina unida a la membrana justo debajo de la membrana plasmática. Al contraerse, tira progresivamente de la membrana plasmática hacia dentro, estrangulando la célula por el centro y dividiéndola en dos. El grosor del anillo contráctil permanece constante según se contrae, lo que implica que los filamentos de actina se desensamblan a medida que avanza la contracción. Tras la división celular el anillo se disgrega por completo. Sorprendentemente, aunque el mecanismo de división de las células vegetales es diferente (véase Cap. 14), la actina se ensambla en la posición de la división celular. La función de la actina parece ser muy antigua desde el punto de vista evolutivo puesto que la proteína bacteriana MrB también interviene en la división celular.

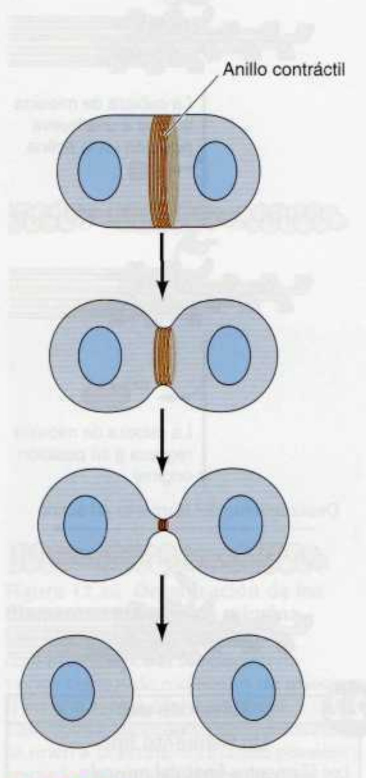


Figura 12.30 Citocinesis. Tras completarse la mitosis (división nuclear), un anillo contráctil formado por filamentos de actina y miosina II divide la célula en dos.

La regulación de la contracción por actina-miosina en el músculo estriado, vista anteriormente, tiene lugar mediante la unión de Ca^{2+} a la troponina. Sin embargo, en las células no musculares y en el músculo liso la contracción se regula principalmente por la fosforilación de una de las cadenas ligeras de la miosina, la denominada cadena ligera reguladora (Fig. 12.31). La fosforilación de la cadena ligera reguladora en estas células tiene al menos dos efectos: promueve el ensamblaje de la miosina en filamentos, y aumenta la actividad catalítica de la miosina, permitiendo que la contracción tenga lugar. La enzima que cataliza esta fosforilación, denominada **quinasa de la cadena ligera de la miosina**, está regulada por la asociación con la proteína de unión de Ca^{2+} **calmodulina**. El aumento del Ca^{2+} citosólico pro-

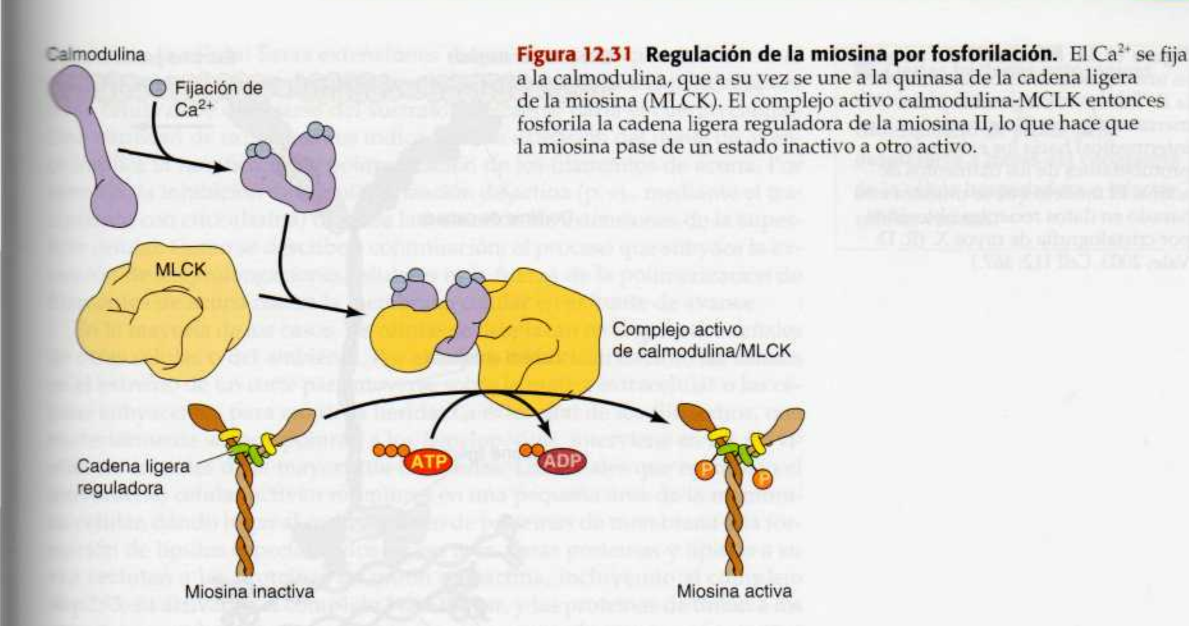


Figura 12.31 Regulación de la miosina por fosforilación. El Ca^{2+} se fija a la calmodulina, que a su vez se une a la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). El complejo activo calmodulina-MCLK entonces fosforila la cadena ligera reguladora de la miosina II, lo que hace que la miosina pase de un estado inactivo a otro activo.

mueve la unión de la calmodulina a la quinasa, lo que origina la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina. Por tanto, el incremento del Ca^{2+} citosólico es el responsable, aunque indirectamente, de la activación de la miosina en el músculo liso y en las células no musculares, así como en el músculo estriado.

Miosinas no musculares

Además de la miosina II (las miosinas de dos cabezas que se encuentran en las células musculares), en las células no musculares se encuentran otros tipos de miosinas. Estas miosinas no poseen colas capaces de formar lazos superenrollados, de modo que no forman filamentos y no están implicadas en la contracción. Sin embargo, pueden estar implicadas en otros tipos de movimientos celulares, tales como el transporte de vesículas de membrana y orgánulos a lo largo de los filamentos de actina, la fagocitosis y la extensión de los pseudópodos en las amebas (véase Fig. 12.20).

Una familia de miosinas no musculares son miembros de la familia de miosina I (Fig. 12.32). Las proteínas de miosina I contienen un grupo globular que forma la cabeza que actúa como un motor molecular, como la de la miosina II, pero las proteínas de miosina I son moléculas mucho más pequeñas (aproximadamente unos 110 kDa en células de mamífero) que carecen de la larga cola de la miosina II. En lugar de formar dímeros, sus colas se unen a otras estructuras, como las vesículas de membrana o los orgánulos. El movimiento de la miosina I a lo largo de un filamento de actina puede entonces transportar la carga que lleve unida. Una función de la miosina I, vista anteriormente, es la formación de los brazos laterales que unen a los filamentos de actina con la membrana plasmática de las microvellosidades intestinales (véase Fig. 12.19). En estas estructuras, la actividad motora de la miosina I puede mover la membrana plasmática a lo largo de los haces de actina hacia la punta de la microvellosidad. La miosina I podría intervenir también en el transporte de las vesículas y de los orgánulos a lo largo de los filamentos de actina y en el movimiento de la membrana plasmática durante la fagocitosis y la extensión de pseudópodos.

Además de las miosinas I y II, al menos otras 12 clases de miosinas no musculares (III hasta XIV) han sido identificadas. Algunas de estas miosi-

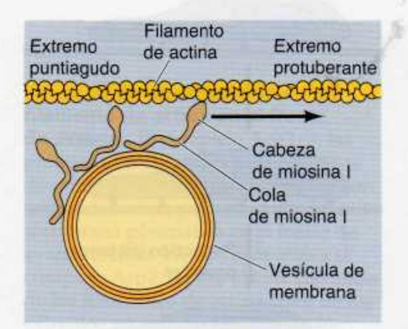


Figura 12.32 Miosina I. La miosina I contiene un grupo de cabeza similar a la miosina II, pero presenta una cola comparativamente pequeña y no forma dímeros ni filamentos. Aunque no puede inducir la contracción, la miosina I puede trasladarse a lo largo de los filamentos de actina (hacia el extremo protuberante) portando diversas cargas (como vesículas de membrana) unidas a su cola.

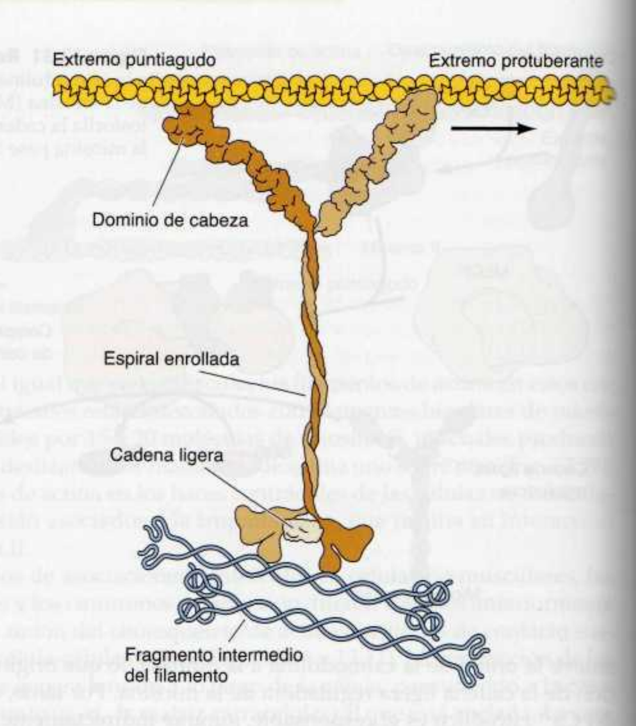


Figura 12.33 Miosina V. La miosina V es una miosina con dos cabezas como la II. Transporta organelos y otra mercancía (p. ej., filamentos intermedios) hacia los extremos protuberantes de los filamentos de actina. El modelo que se muestra está basado en datos recientes obtenidos por cristalografía de rayos X. (R. D. Vale, 2003. *Cell* 112: 467.)

nas no musculares tienen una cabeza, como la miosina I, mientras que otras como miosina V (Fig. 12.33) poseen dos cabezas, como la miosina II. Las funciones de la mayor parte de estas miosinas no musculares no se han determinado, pero se ha demostrado claramente que algunas desempeñan un papel importante en el movimiento de los orgánulos (miosinas V y VI) y en funciones sensoriales tales como la visión (miosina III) y la audición (miosinas VI y VII). La miosina VI es aparentemente única entre las miosinas porque se mueve hacia los extremos puntiagudos de los filamentos de actina. Finalmente, otras miosinas no transportan mercancías sino que participan en la reorganización de los filamentos de actina o anclan los filamentos de actina a la membrana plasmática.

Formación de extensiones y movimiento celular

El movimiento de las células sobre una superficie representa una forma básica de locomoción celular, empleada por varios tipos de células. Ejemplos de esto son los movimientos de las amebas, la migración de las células embrionarias durante el desarrollo, la invasión de tejidos por los glóbulos blancos sanguíneos para combatir una infección, la migración de las células implicadas en la cicatrización de las heridas y la propagación de las células cancerosas durante la metástasis de los tumores malignos. Movimientos similares son también los responsables de la fagocitosis y de la extensión de las prolongaciones de las células nerviosas durante el desarrollo del sistema nervioso. Todos estos movimientos están basados en especializaciones locales y extensiones de la membrana plasmática dirigidas por las propiedades dinámicas del citoesqueleto de actina.

El movimiento celular o la extensión de procesos celulares largos, implica un ciclo coordinado de movimientos, que pueden visualizarse en varios estadios (Fig. 12.34). En primer lugar, las células deben desarrollar una polaridad inicial vía especialización de la membrana plasmática o la corteza celular. En segundo lugar, las extensiones como pseudópodos, lamelipodios o filopodios (véase Fig. 12.20) deben extender para establecer un frente de

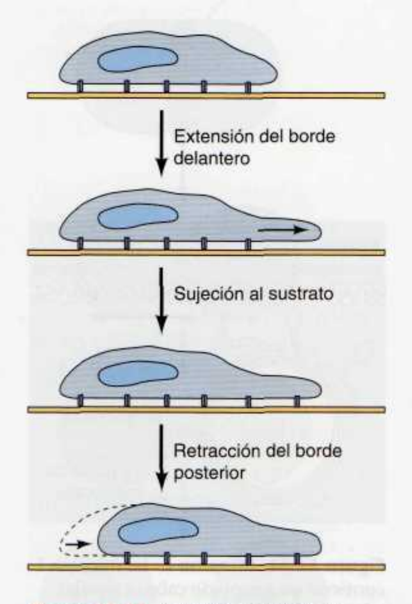


Figura 12.34 Arrastre celular. El movimiento de arrastre de las células a través de una superficie puede considerarse como tres pasos de un movimiento coordinado: 1) extensión del borde delantero; 2) sujeción de la zona anterior al sustrato, y 3) retracción de la parte posterior de la célula hacia el cuerpo celular.

avance de la célula. Estas extensiones deben a continuación adherirse al sustrato sobre el que se desplaza la célula. Finalmente, el frente de arrastre de la célula debe disociarse del sustrato y retraerse hacia el cuerpo celular. Una variedad de experimentos indican que la extensión del frente de avance implica la ramificación y polimerización de los filamentos de actina. Por ejemplo, la inhibición de la polimerización de actina (p. ej., mediante el tratamiento con citocalasina) bloquea la formación de extensiones de la superficie celular. Como se describe a continuación, el proceso que subyace la extensión de las prolongaciones celulares es la fuerza de la polimerización de filamentos de actina contra la membrana celular en el frente de avance.

En la mayoría de los casos, las células se desplazan en respuesta a señales de otras células o del ambiente. Por ejemplo, en la cicatrización, las células en el extremo de un corte para moverse sobre la matriz extracelular o las células subyacentes para cubrir la herida. La extensión de los filopodios, que posteriormente se incorporarán a los lamelopodios, interviene en los movimientos iniciales de la mayoría de las células. Las señales que estimulan el movimiento celular activan receptores en una pequeña área de la membrana celular, dando lugar al reclutamiento de proteínas de membrana y la formación de lípidos especializados en esa área. Estas proteínas y lípidos a su vez reclutan a las proteínas de unión a la actina, incluyendo al complejo Arp2/3, su activador el **complejo WASP/Scar**, y las proteínas de unión a los *extremos protuberantes que conectan los filamentos de actina en crecimiento* con la membrana plasmática (Fig. 12.35). WASP/Scar activa al complejo Arp2/3, que a su vez inicia ramas de los filamentos de actina cerca de los extremos protuberantes, incrementando así el número de extremos protuberantes en crecimiento que son capaces de empujar la membrana celular. A concentraciones locales elevadas de ATP-actina, el crecimiento de los extremos protuberantes de los filamentos de actina es favorable energéticamente y puede generar una fuerza considerable. Mientras que un solo fragmento no ejercería la suficiente fuerza como para extender la membrana celular, muchos filamentos pueden hacerlo con facilidad.

A medida que los extremos protuberantes de los filamentos de actina en el frente de avance se ramifican y crecen, los extremos puntiagudos de los filamentos son desensamblados activamente por acción de la ADF/cofilina. Los monómeros de ADP-actina se transportan hacia los extremos protuberantes en crecimiento por acción de la **twinfilina** y se reactivan a través del intercambio de ADP/ATP mediado por la profilina. A medida que se ex-

■ **Ciertas bacterias patogénicas desvían la dinámica normal del citoesqueleto de actina para desplazarse a través del citoplasma de la célula hospedadora e infectar células vecinas.**

Figura 12.35 Ramificación de un filamento de actina en el frente de avance. El complejo Arp2/3, las proteínas WASP/Scar, y las proteínas de unión al extremo protuberantes son reclutadas a una pequeña área de la membrana plasmática en el frente de avance celular. WASP/Scar activa el complejo Arp2/3 para iniciar las ramas de los filamentos de actina cerca de los extremos protuberantes, que están conectados con la membrana plasmática mediante las proteínas de unión a extremos protuberantes. En los extremos puntiagudos de los filamentos, los monómeros de ADP-actina son eliminados por acción de la ADF/cofilina. Los monómeros de ADP-actina son transportados a los extremos protuberantes en crecimiento mediante la twinfilina y reactivados mediante el intercambio ADP/ATP por acción de la profilina.

tienden los nuevos microfilamentos en el proceso celular en crecimiento, los microtúbulos reorganizados y nuevos microfilamentos proporcionan vías para el envío de vesículas lipídicas y proteínas necesarias para una extensión continuada. En las neuronas, la miosina V es necesaria para proporcionar los nuevos componentes de membrana para la extensión de los filopodios. La regulación de estos procesos implica a las proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP de la familia Rho, que se estudian en el Capítulo 15.

La adhesión celular a la superficie requiere una reconstrucción del sustrato celular o de adhesiones célula-célula. Para las células con un movimiento lento, como las células epiteliales o los fibroblastos, la adhesión implica la formación de adhesiones focales (véase Fig. 12.16). Entre las proteínas mercancía enviadas a la extensión celular en crecimiento por los filamentos de actina y los microtúbulos, se encuentran las proteínas empaquetadoras de actina (necesarias para la formación de paquetes de actina y fibras de estrés inmediatamente detrás del frente de avance) además de las proteínas de adhesión focal, como la talina y la vinculina. Las proteínas de los filamentos intermedios también son transportadas hacia el frente de avance donde se utilizan para la reorganización de la red de filamentos intermedios.

La reconstrucción de las adhesiones focales tiene lugar en dos pasos: la aparición de pequeños complejos focales que contienen pocos filamentos de actina adheridos a integrinas, y el crecimiento de dichos complejos focales para dar contactos focales maduros (ilustrados en la Fig. 12.16). La vinculina y la talina son activadas mediante el contacto con los lípidos de la membrana celular. A su vez activan integrinas para que se unan a la matriz extracelular, además de conectar las integrinas con los filamentos de actina. La aparición de contactos focales maduros también requiere el desarrollo de tensión entre la célula y el sustrato, que es generada mediante la acción de los motores de miosina sobre los paquetes de actina o las fibras de estrés. Las células que se mueven a mayor velocidad, como las amebas o los glóbulos blancos, forman contactos difusos con el sustrato, cuya composición molecular es desconocida.

El estadio final de la migración celular —retracción del extremo de arrastre— implica la acción de las proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP de la familia ARF (véase Cap. 10) y familias Rho que regulan la degradación de las adhesiones focales existentes y estimulan la endocitosis de la membrana plasmática en el extremo de arrastre de la célula. El deslizamiento de microfilamentos en los paquetes de actina y las fibras de estrés conectados con las nuevas adhesiones focales en el frente de avance, mediado por miosina II, genera la fuerza necesaria para arrastrar el extremo de arrastre de la célula hacia delante.

Filamentos intermedios

Los **filamentos intermedios** poseen diámetros de entre 8 nm y 11 nm, que es intermedio entre los diámetros de los otros dos elementos principales del citoesqueleto, los filamentos de actina (de unos 7 nm) y los microtúbulos (de unos 25 nm). A diferencia de los filamentos de actina y de los microtúbulos, los filamentos intermedios no están directamente implicados en los movimientos celulares. En lugar de ello, ambos parecen desempeñar una función estructural al conferir resistencia mecánica a las células y los tejidos y crear un armazón en el que pueden tener lugar diversos procesos celulares. Se conocen, al menos, tres clases diferentes de bacterias que contienen proteínas que podrían representar los antepasados evolutivos de los filamentos intermedios eucarióticos y que se ensamblan para formar filamentos en la cara interna de la membrana bacteriana.

Tabla 12.2 Proteínas de los filamentos intermedios

Tipo	Proteína	Tamaño (kDa)	Lugar de expresión
I	Queratinas ácidas (11 proteínas)	40–60	Células epiteliales
II	Queratinas neutras o básicas (8 proteínas)	50–70	Células epiteliales
III	Vimentina	54	Fibroblastos, glóbulos blancos sanguíneos y otros tipos de células
	Desmina	53	Células musculares
	Proteína ácida fibrilar glial	51	Células gliales
	Periferina	57	Neuronas periféricas
IV	Proteínas de neurofilamentos		
	NF-L	67	Neuronas
	NF-M	150	Neuronas
	NF-H	200	Neuronas
	α-Internexina	66	Neuronas
V	Láminas nucleares	60–75	Lámina nuclear de todo tipo de células
VI	Nestina	200	Células madre del sistema nervioso central

Las nestinas a veces se clasifican como tipo IV en lugar de como filamentos intermedios de tipo VI.

Proteínas de los filamentos intermedios

Mientras que los filamentos de actina y los microtúbulos son polímeros constituidos por un solo tipo de proteínas (actina y tubulina, respectivamente), los filamentos intermedios están compuestos por diversas proteínas que se expresan en distintos tipos de células. Más de 65 proteínas diferentes de filamentos intermedios han sido identificadas y clasificadas en seis grupos en función de las similitudes entre sus secuencias de aminoácidos (Tabla 12.2). Los tipos I y II son dos grupos de **queratinas**, constituidos cada uno por aproximadamente 15 proteínas diferentes, que se expresan en las células epiteliales. Cada tipo de célula epitelial sintetiza al menos una queratina de tipo I (ácida) y una de tipo II (neutra/básica), que copolimerizan para formar filamentos. Algunas queratinas de tipos I y II (denominadas queratinas duras) son constituyentes de estructuras tales como pelo, uñas y cuernos. Las otras queratinas de tipos I y II (queratinas blandas) son abundantes en el citoplasma de las células epiteliales, expresándose queratinas diferentes en los distintos tipos celulares diferenciados.

Las proteínas tipo III de filamentos intermedios incluyen a la **vimentina**, que se encuentra en diferentes tipos de células, incluyendo fibroblastos, células de músculo liso y glóbulos blancos sanguíneos. A diferencia de los filamentos de actina, la vicentina forma una red que se extiende desde el núcleo hacia la periferia celular. Otra proteína tipo III, la **desmina**, se expresa de manera específica en las células musculares, donde conecta los discos Z de los elementos contráctiles individuales. Una tercera proteína tipo III de filamentos intermedios se expresa de forma específica en las células gliales, y una cuarta en neuronas del sistema nervioso periférico.

Las proteínas tipo IV de filamentos intermedios incluyen a las tres **proteínas de neurofilamentos (NF)** (designadas NF-L, NF-M, y NF-H de *l*ight —ligera—, *m*edium —media—, *h*eavy —pesada—, respectivamente). Estas proteínas forman los filamentos intermedios principales de muchos tipos de neuronas maduras. Abundan principalmente en los axones de las neuronas motoras y se piensa que desempeñan un papel crítico en el sostén de estas prolongaciones largas y delgadas, que pueden extenderse más de un metro de longitud. Otra proteína tipo IV (α-internexina) se expresa en una



Figura 12.36 Estructura de las proteínas de filamentos intermedios. Las proteínas de filamentos intermedios contienen un dominio en α-hélice como eje central de, aproximadamente, 310 aminoácidos (350 aminoácidos en las láminas nucleares). El dominio de cabeza N-terminal y el dominio de cola C-terminal varían en tamaño y forma.

etapa anterior del desarrollo neuronal, previa a la expresión de las proteínas de neurofilamentos. Las proteínas tipo V de filamentos intermedios son las láminas nucleares, que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. En vez de ser parte del citoesqueleto, las láminas nucleares son componentes del núcleo, donde se ensamblan para formar una red ortogonal sobre la que se asienta la envuelta nuclear y que se extiende difusamente hacia el interior nuclear (véase Fig. 9.5). Las nestinas (filamentos intermedios de tipo VI) se expresan durante el desarrollo embrionario en diversos tipos de células madre. Difieren de otros filamentos intermedios en que sólo polimerizan si están presentes en la célula otros filamentos intermedios; las nestinas en ocasiones se clasifican como pertenecientes al tipo IV en lugar del tipo VI de los filamentos intermedios.

A pesar de la considerable diversidad en el tamaño y en la secuencia de aminoácidos, las diferentes proteínas de filamentos intermedios muestran una organización estructural común (Fig. 12.36). Todas las proteínas de filamentos intermedios tienen un dominio en α-hélice como eje central de aproximadamente 310 aminoácidos (350 aminoácidos en las láminas nucleares). Este dominio de eje central está flanqueado por dominios amino- y carboxilo- terminales, que varían entre las diferentes proteínas de filamentos intermedios en tamaño, secuencia y estructura secundaria. Como se tratará a continuación, el dominio central en α-hélice juega un papel fundamental en el ensamblaje de los filamentos, mientras que los dominios variables de la cabeza y la cola presumiblemente determinan las funciones específicas de las diferentes proteínas de los filamentos intermedios.

Ensamblaje de los filamentos intermedios

El primer paso en el ensamblaje de los filamentos es la formación de dímeros en los cuales los dominios de eje central de dos cadenas polipeptídicas están enrollados uno alrededor del otro en una estructura de espiral enrollada (*coiled-coil*), similar a la formada por las cadenas pesadas de la miosina II (Fig. 12.37). Los dímeros entonces se asocian de un modo escalonado antiparalelo para formar tetrámeros, que se ensamblan extremo con extremo para formar protofilamentos. Un paso común es la interacción de aproximadamente ocho protofilamentos enrollados entre sí en una estructura similar a una cuerda. Debido a que el ensamblaje se produce a partir de tetrámeros antiparalelos, ambos extremos de los filamentos intermedios son equivalentes. Por tanto, y a diferencia de los filamentos de actina y de los microtúbulos, los filamentos intermedios son apolares; no tienen extremos diferenciados, como los extremos protuberantes y puntiagudos de los filamentos de actina.

El ensamblaje de filamentos requiere interacciones entre los tipos específicos de proteínas de filamentos intermedios. Por ejemplo, los filamentos de queratina siempre se ensamblan a partir de heterodímeros que contienen un polipéptido de tipo I y uno de tipo II. Por el contrario, las proteínas de tipo III pueden ensamblarse en filamentos constituidos por un único polipéptido (p. ej., vimentina) o constituidos por dos proteínas de tipo III diferentes (p. ej., vimentina más desmina). Sin embargo, las proteínas de tipo III no forman copolímeros con las queratinas. Entre las proteínas de tipo IV, la α-internexina puede ensamblarse en filamentos consigo misma, mientras que las tres proteínas de neurofilamentos copolimerizan para formar heteropolímeros.

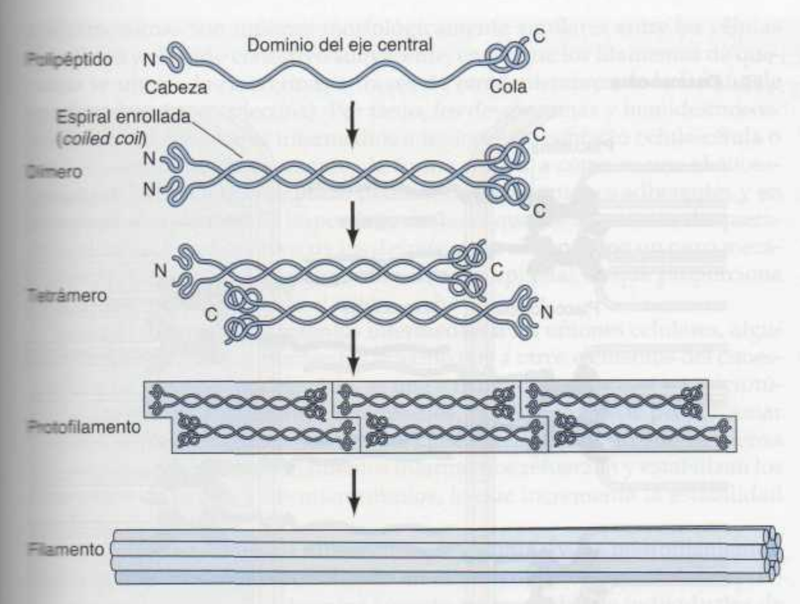


Figura 12.37 Ensamblaje de los filamentos intermedios. Los dominios del eje central de dos *polipéptidos se enrollan uno con otro* en una estructura de espiral enrollada (*coiled coil*) para formar dímeros. Los dímeros entonces se asocian de un modo escalonado antiparalelo para formar tetrámeros. Los tetrámeros se asocian extremo con extremo para formar protofilamentos y lateralmente para formar filamentos. Cada filamento contiene aproximadamente ocho protofilamentos enrollados uno alrededor del otro en una estructura a modo de cuerda.

Los filamentos intermedios suelen ser más estables que los filamentos de actina o los microtúbulos y no exhiben el comportamiento dinámico asociado a estos otros elementos del citoesqueleto (p. ej., el intercambio rotatorio de los filamentos de actina que se muestra en la Fig. 12.4). Sin embargo, las proteínas de filamento intermedio suelen ser modificadas por fosforilación, que puede regular su ensamblaje y desensamblaje en la célula. El ejemplo más claro es la fosforilación de las láminas nucleares (véase Cap. 16), que da como resultado en el desensamblaje de la lámina nuclear y la disgregación de la envuelta nuclear durante la mitosis. Los filamentos intermedios citoplasmáticos, como la vimentina, también son fosforilados, lo que puede llevar a su desensamblaje y reorganización durante los procesos de división o migración celular.

Organización intracelular de los filamentos intermedios

Los filamentos intermedios forman una elaborada red en el citoplasma de la mayoría de las células, extendiéndose a partir de un anillo que rodea al núcleo hasta la membrana plasmática (Fig. 12.38). Tanto los filamentos de queratina como los de vimentina se fijan a la envuelta nuclear, aparentemente con la función de posicionar y anclar el núcleo dentro de la célula. Además, los filamentos intermedios pueden asociarse no sólo con la membrana plasmática sino también con los otros elementos del citoesqueleto, filamentos de actina y microtúbulos. Por tanto, los filamentos intermedios proporcionan un andamiaje que integra a los componentes del citoesqueleto y organiza la estructura interna de la célula.

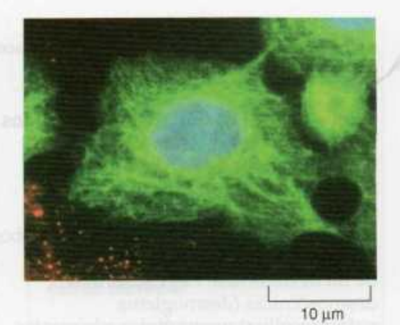


Figura 12.38 Organización intracelular de los filamentos de queratina. Micrografía de células epiteliales teñidas con anticuerpos fluorescentes contra la queratina (verde). El núcleo se ha teñido de azul. Los filamentos de queratina se extienden a partir de un anillo que rodea al núcleo hasta la membrana plasmática. (Nancy Kedersha/Immunogen/Photo Researchers, Inc.)

Los filamentos de queratina de las células epiteliales están fuertemente anclados a la membrana plasmática en dos áreas especializadas de contacto celular, los **desmosomas** y **hemidesmosomas** (Fig. 12.39). Los desmosomas son uniones entre células adyacentes, en las que los contactos célula-célula están mediados por proteínas transmembrana relacionadas con las cadherinas. En su lado citoplasmático, los desmosomas se asocian con una placa densa característica de proteínas intracelulares, a la que se anclan los filamentos de queratina. Estos anclajes están mediados por la desmoplaquina, un miembro de una familia de proteínas denominadas **plaquinas** que unen filamentos intermedios y los vinculan a otras estructuras celulares. Los he-

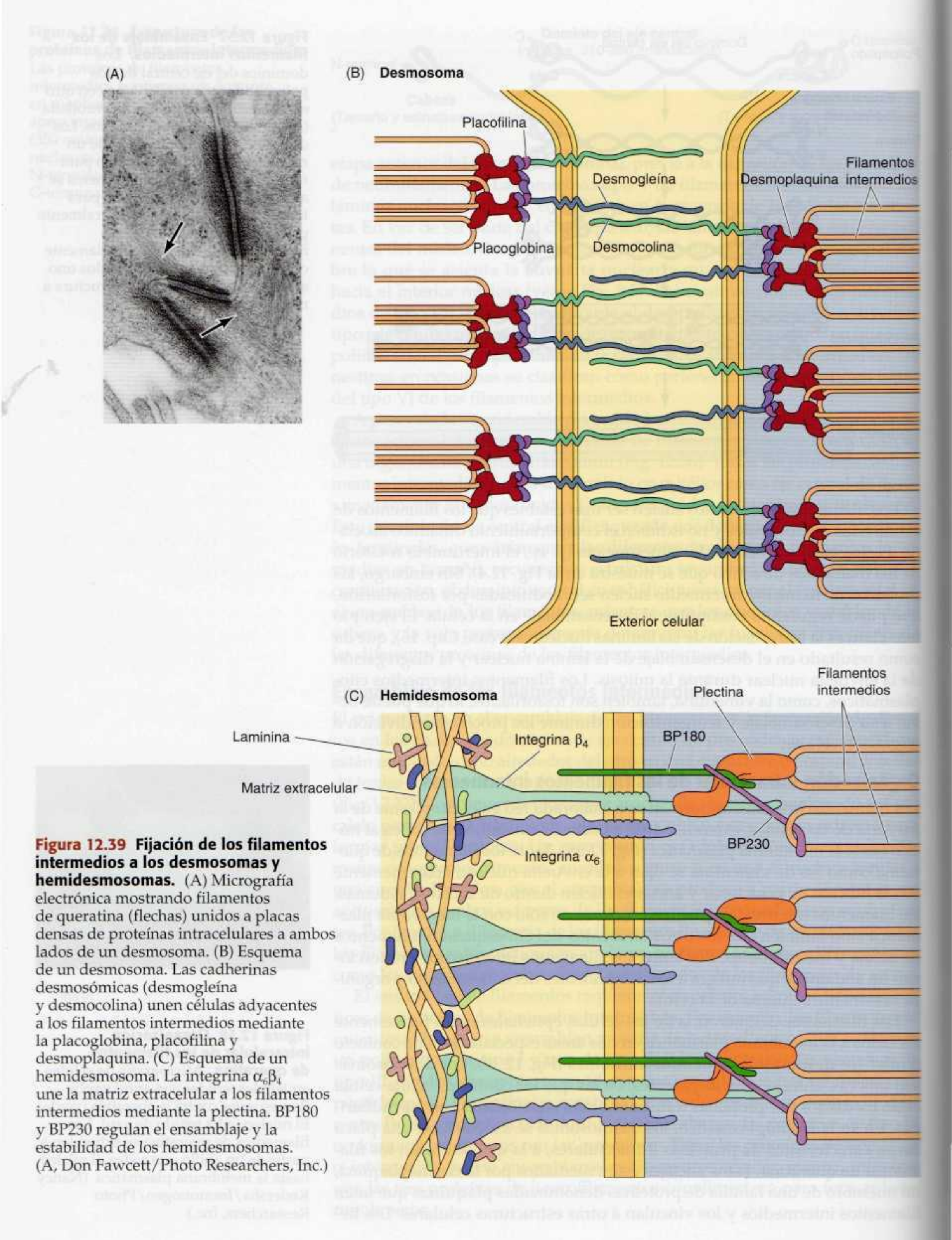


Figura 12.39 Fijación de los filamentos intermedios a los desmosomas y hemidesmosomas. (A) Micrografía electrónica mostrando filamentos de queratina (flechas) unidos a placas densas de proteínas intracelulares a ambos lados de un desmosoma. (B) Esquema de un desmosoma. Las cadherinas desmosómicas (desmogleína y desmocolina) unen células adyacentes a los filamentos intermedios mediante la placoglobina, placofilina y desmoplaquina. (C) Esquema de un hemidesmosoma. La integrina $\alpha_6\beta_4$ une la matriz extracelular a los filamentos intermedios mediante la plectina. BP180 y BP230 regulan el ensamblaje y la estabilidad de los hemidesmosomas. (A, Don Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

midesmosomas son uniones morfológicamente similares entre las células epiteliales y el tejido conectivo subyacente, en las que los filamentos de queratina se unen a las integrinas a través de otros miembros de la familia de las plaquinas (p. ej., plectina). Por tanto, los desmosomas y hemidesmosomas unen los filamentos intermedios a regiones de contacto célula-célula o célula-sustrato, respectivamente, de forma similar a como se une el citoesqueleto de actina a la membrana plasmática en las uniones adherentes y en las adhesiones focales. Es importante destacar que los filamentos de queratina anclados a ambos lados de los desmosomas sirven como un nexo mecánico entre las células adyacentes de una capa epitelial, lo que proporciona estabilidad mecánica a todo el tejido.

Además de unir los filamentos intermedios a las uniones celulares, algunas plaquinas unen los filamentos intermedios a otros elementos del citoesqueleto. La plectina, por ejemplo, se une a filamentos de actina y a microtúbulos además de a filamentos intermedios, por lo que puede proporcionar puentes entre estos componentes del citoesqueleto (Fig. 12.40). Se piensa que estos puentes con los filamentos intermedios refuerzan y estabilizan los filamentos de actina y los microtúbulos, lo que incrementa la estabilidad mecánica de la célula.



Figura 12.40 Micrografía electrónica de puentes de plectina entre filamentos intermedios y microtúbulos. Micrografía de un fibroblasto teñido con un anticuerpo contra la plectina. La micrografía ha sido coloreada artificialmente para mostrar la plectina (verde), los anticuerpos contra la plectina (amarillo), los filamentos intermedios (azul) y los microtúbulos (rojo). (Cortesía de Tatyana Svitkina y Gary Borisy, University of Wisconsin/Madison.)

Dos tipos de filamentos intermedios, la desmina y los neurofilamentos, desempeñan un papel especializado en el músculo y en las células nerviosas, respectivamente. La desmina conecta los ensamblajes individuales de actina-miosina de las células musculares entre sí y a la membrana plasmática, vinculando de esta manera la acción de los elementos contráctiles individuales. Los neurofilamentos son los filamentos intermedios principales en la mayoría de las neuronas maduras. Son particularmente abundantes en los largos axones de las motoneuronas, donde parece que se anclan a los filamentos de actina y a los microtúbulos a través de miembros neuronales de la familia de las plaquinas. Se piensa que los neurofilamentos desempeñan un papel importante en proporcionar soporte mecánico y en estabilizar otros elementos del citoesqueleto en estas extensiones largas y delgadas de las células nerviosas.

Funciones de las queratinas y neurofilamentos: enfermedades de la piel y sistema nervioso

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que los filamentos intermedios proporcionan un soporte estructural a la célula, sólo recientemente se ha obtenido una evidencia directa de su función. Algunas células en cultivo no fabrican proteínas de filamentos intermedios, lo que indica que estas proteínas no se requieren para el crecimiento de las células *in vitro*. De forma similar, al inyectar anticuerpo contra vimentina en células cultivadas se disgregan las redes de filamentos intermedios sin afectar al crecimiento celular o al movimiento. Por tanto, se cree que la función principal de los filamentos intermedios consiste en conferir resistencia al citoesqueleto de las células en los tejidos de los organismos multicelulares, donde éstos están sujetos a una gran variedad de tensiones mecánicas que no afectan a las células en el ambiente aislado de una placa de cultivo.

■ Las propiedades físicas de los filamentos intermedios están bien adaptadas a su papel de proporcionar soporte estructural. Normalmente no son muy rígidos pero se endurecen y resisten la rotura cuando se someten a un estrés elevado.

La evidencia experimental de tal papel *in vivo* de los filamentos intermedios se obtuvo por primera vez en 1991 mediante estudios en el laboratorio de Elaine Fuchs. Estos investigadores utilizaron ratones transgénicos para investigar los efectos *in vivo* de la expresión de un mutante de deleción de queratina, que codificaba un polipéptido incompleto que imposibilitaba que se formaran filamentos normales de queratina (Fig. 12.41). Este gen mutado de queratina se introdujo en los ratones transgénicos, donde fue expresado en las células basales de la epidermis e impedía la formación de un citoesqueleto de queratina normal. Este hecho desembocó en el desarrollo



EXPERIMENTO CLAVE

La expresión de una queratina mutante causa un desarrollo anómalo de la piel

La expresión de una queratina mutante en ratones transgénicos causa serias anomalías semejates a una enfermedad genética humana de la piel

Robert Vassar, Pierre A. Coulombe, Linda Degenstein, Kathryn Albers y Elaine Fuchs
University of Chicago
Cell, 1991, Volumen 64, págs. 365-380


Elaine Fuchs

Contexto

En 1991, los filamentos intermedios de las células epiteliales eran bien conocidos y se estaba estudiando la aparición, a lo largo del desarrollo, de diferentes formas de queratinas de tipo I y tipo II en la piel. Lo que permanecía desconocido para cualquier filamento intermedio era su función. Mientras que todas las células de los vertebrados contienen filamentos intermedios, las líneas celulares que carecen de ellos sobreviven en cultivo y siguen proliferando. Así, cualquiera que fuese su función, no eran importantes para las células en cultivo, aunque quizás sí para las células en el interior de los tejidos de organismos multicelulares.

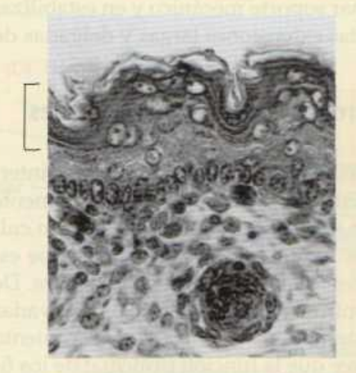
Fuchs y sus colaboradores sabían que durante el desarrollo temprano, el epitelio de la piel expresaba queratina 5 (de tipo I) y queratina 14 (de tipo II). Puesto que las queratinas polimerizan como heterodímeros, se creía que la expresión de una proteína anómala podía interferir con la formación de los filamentos intermedios normales. Fuchs y sus colaboradores inicialmente estudiaron esta posibilidad en células de la piel en cultivo, y demostraron que la expresión de una queratina 14 truncada, interfería con la formación de los filamentos de queratina. Esto sugería que la expresión similar de una queratina mutante en ratones transgénicos, podría causar un defecto en la red de filamentos intermedios de las células de la piel de un embrión. Si esto ocurría, proporcionaría una prueba del papel de los filamentos intermedios en el tejido intacto.

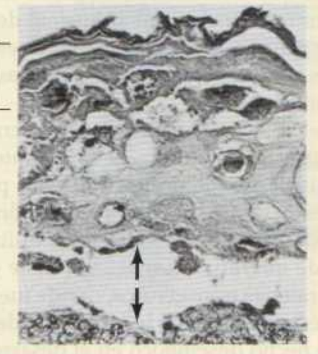
En los experimentos aquí descritos, Fuchs y sus colaboradores demostraron que la expresión de una queratina mutante en ratones transgénicos, no sólo alteraba la red de los filamentos intermedios en las células de la piel, sino que también desencadenaba defectos severos en la organización y estabilidad del tejido de la piel. Así, estos experimentos proporcionaron la primera demostración de un papel fisiológico para los filamentos intermedios.

Experimentos

Para sus primeros experimentos en células en cultivo, Fuchs y colaboradores construyeron un gen de queratina 14 mutante, en el que se expresaba una proteína truncada que carecía del 30% de la región central del dominio α-hélice y de toda la cola carboxilo terminal, a partir del promotor normal de la queratina. Para investigar el papel de la queratina 14 en el desarrollo temprano del ratón, introdujeron el plásmido que codificaba esta queratina 14 mutante en óvulos fertilizados de ratón, que se transfirieron a madres adoptivas y se permitió el desarrollo de la descendencia. Toda la descendencia fue analizada para la queratina 14, y algunos eran transgénicos y expresaban la queratina 14 mutante.

La mayoría de los animales transgénicos murieron en las 24 horas siguientes al nacimiento. Aquellos que sobrevivieron más tiempo mostraron anomalías severas de la piel, incluyendo ampollas debido a la lisis de células epidérmicas después de traumas mecánicos leves, como el rozamiento de la piel. El análisis mediante tinción de secciones de tejido de la piel de los animales





Piel de un ratón normal y uno transgénico. (Arriba) Piel de un ratón normal que muestra las capas externas altamente organizadas (corchetes) sin espacios intermedios entre el tejido intacto subyacente. (Abajo) Piel de un ratón transgénico que muestra una severa desorganización de las capas externas, que contienen espacios debido a la abrasión por traumatismos mecánicos y se encuentran separadas del tejido subyacente (flechas).

EXPERIMENTO CLAVE

transgénicos, demostró la severa desorganización de la epidermis de los animales más afectados (véase figura) y zonas de tejido desorganizado en el resto. La expresión por zonas, es característica de un animal mosaico donde parte del tejido se desarrolla a partir de células embrionarias normales y otra a partir de células que portan el transgén. Analizando la expresión de la proteína mutante, encontraron que las áreas de tejido desorganizado se correlacionaban con la expresión de la queratina 14 mutante. Adicionalmente, existía una clara correlación entre la cantidad de epidermis desorganizada y la susceptibilidad de sufrir lesiones de la piel y la muerte durante el trauma del nacimiento.

Fuchs y sus colaboradores observaron además que el patrón de desorganización tisular en los ratones transgénicos se parecía al observado en un grupo de enfermedades cutáneas humanas denominadas epidermólisis bullosa simplex. Así, compararon secciones de tejido de ratones transgénicos, con secciones obtenidas de la piel de un paciente humano, y encontraron patrones muy similares de alteración tisular. A partir de estas observaciones, Fuchs y sus colaboradores concluyeron que los defectos en las queratinas o proteínas de los filamentos intermedios podían ser una causa de enfermedades genéticas humanas de la piel.

Impacto

Las anomalías de la piel de estos ratones transgénicos proporcionaron la primera prueba directa del presunto papel de las queratinas, como fuentes de fuerza mecánica para las células epiteliales en los tejidos. Actualmente, se sabe que el citoesqueleto de los filamentos intermedios es crítico para la estructura de los tejidos como la piel, intestino, corazón y el músculo esquelético, que están sujetos a estrés mecánico. Por el contrario, los eucariotas unicelulares como las levaduras y muchos pequeños invertebrados, sobreviven perfectamente en ausencia de filamentos intermedios, a menudo modificando el citoesqueleto de actina o de tubulina para que cumpla un papel estructural. Los resultados de Fuchs y sus colaboradores también sugirieron una base para varias enfermedades humanas. De hecho, existen ahora más de diecisiete queratinas diferentes cuya defectuosidad se asocia con enfermedades humanas; estas incluyen tanto a la queratina 5 como a la queratina 14, inicialmente estudiadas en ratones transgénicos.

de alteraciones graves en la piel, incluyendo ampollas debido a lisis celular epidérmica tras un trauma mecánico suave, tal como frotarse la piel. De esta forma las alteraciones de la piel de estos ratones transgénicos supusieron un apoyo directo al supuesto papel de las queratinas en proporcionar resistencia mecánica a las células epiteliales de los tejidos. Posteriormente, se obtuvo el mismo resultado en ratones en los que el gen para la misma queratina estaba inactivado por recombinación homóloga.

Estos experimentos también apuntaron a la base molecular de una enfermedad genética humana, la epidermólisis bullosa simple (EBS). Al igual que los ratones transgénicos que expresan los genes de queratina mutante,

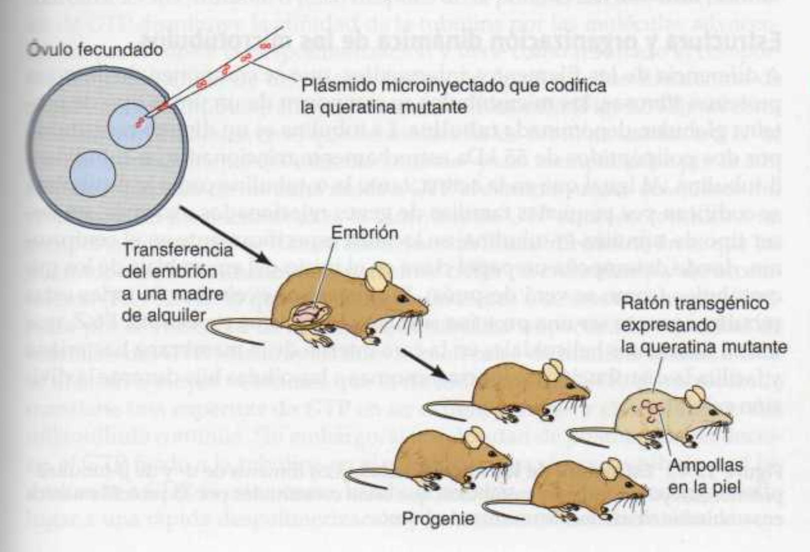


Figura 12.41 Demostración experimental de la función de la queratina. Un plásmido que codifica una queratina mutante que interfiere en el ensamblaje normal de los filamentos de queratina se microinyectó dentro de un pronúcleo de un huevo fecundado. El embrión microinyectado fue entonces transferido a una madre de alquiler, y algunos miembros de la descendencia incorporaron el gen de la queratina mutante en su genoma. La expresión del gen mutado en estos ratones transgénicos alteró el citoesqueleto de queratina de las células de la epidermis, dando lugar a la aparición de graves ampollas en la piel debido a lisis celular tras una tensión mecánica suave (p. ej., roce).

los pacientes con esta enfermedad desarrollan ampollas en la piel como consecuencia de una lisis celular después de un trauma leve. Esta similitud condujo a realizar estudios de los genes de la queratina en los pacientes EBS, que demostraron que la EBS está causada por mutaciones en el gen de la queratina que interfieren en el ensamblaje normal de los filamentos de queratina. De esta forma, tanto los estudios experimentales en ratones transgénicos como el análisis molecular de una enfermedad genética humana han demostrado el papel de las queratinas en permitir soportar tensiones mecánicas a las células de la piel. Estudios posteriores han mostrado que las mutaciones en otras queratinas son responsables de otras enfermedades congénitas de la piel, que se caracterizan de forma similar por una fragilidad anormal en las células epidérmicas.

Otros estudios en ratones transgénicos han implicado a neurofilamentos alterados en enfermedades de las neuronas motoras, particularmente en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La ELA, conocida como enfermedad de Lou Gehrig y como la enfermedad que afecta al renombrado físico Stephen Hawking, resulta de una pérdida progresiva de las neuronas motoras, que a su vez conduce a una atrofia muscular, parálisis y posterior muerte. La ELA y otros tipos de enfermedades de las motoneuronas se caracterizan por la acumulación y ensamblaje anormal de los neurofilamentos, lo que sugiere que las alteraciones en los neurofilamentos podrían contribuir a estas patologías. De acuerdo con esta posibilidad, se ha hallado que la sobreexpresión de NF-L o de NF-H en ratones transgénicos da lugar al desarrollo de un estado similar a la ELA. Aunque aún no se comprenden los mecanismos implicados, estos experimentos sugieren claramente que los neurofilamentos intervienen en la patogénesis de las enfermedades de las neuronas motoras.

Microtúbulos

Los **microtúbulos**, el tercer componente principal del citoesqueleto, son varillas rígidas y huecas de aproximadamente 25 nm de diámetro. Al igual que los filamentos de actina, los microtúbulos son estructuras dinámicas que están continuamente ensamblándose y desensamblándose en la célula. Intervienen en la determinación de la forma celular y en diversos movimientos celulares, incluyendo algunas formas de locomoción celular, el transporte intracelular de orgánulos, y la separación de los cromosomas durante la mitosis.

Estructura y organización dinámica de los microtúbulos

A diferencia de los filamentos intermedios, que se componen de diversas proteínas fibrosas, los microtúbulos se componen de un único tipo de proteína globular, denominada **tubulina**. La tubulina es un dímero constituido por dos polipéptidos de 55 kDa estrechamente relacionados, α-tubulina y β-tubulina. Al igual que en la actina, tanto la α-tubulina como la β-tubulina se codifican por pequeñas familias de genes relacionados. Además, un tercer tipo de tubulina (γ-tubulina) se localiza específicamente en el centrosoma, donde desempeña un papel clave en el inicio del ensamblaje de los microtúbulos (como se verá después). El progenitor evolutivo de todas estas tubulinas parece ser una proteína similar a la proteína procariota, FtsZ, que forma filamentos helicoidales en la cara interna de la membrana bacteriana y facilita la distribución de los cromosomas a las células hija durante la división celular.

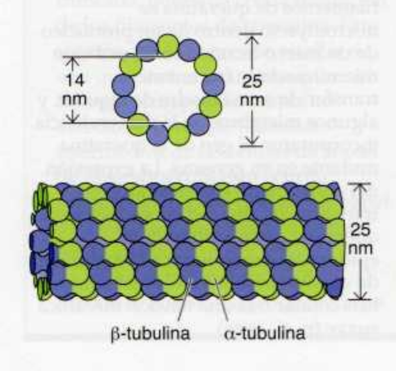


Figura 12.42 Estructura de los microtúbulos. Los dímeros de α- y de β-tubulina polimerizan para formar microtúbulos, que están constituidos por 13 protofilamentos ensamblados alrededor de un corazón hueco.

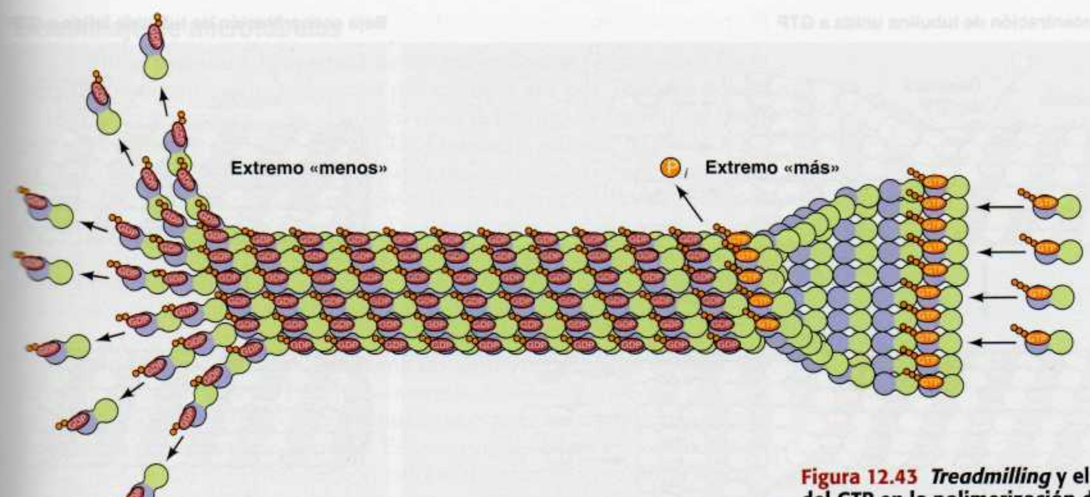


Figura 12.43 ***Treadmilling* y el papel del GTP en la polimerización de microtúbulos.** Los extremos «menos» crecen a menor velocidad que los extremos «más» de los microtúbulos. Esta diferencia en la tasa de crecimiento se refleja en una diferencia de la concentración crítica para la adición de dímeros de tubulina a los extremos del microtúbulo. Los dímeros de tubulina con GTP unidos a β-tubulina se asocian con los extremos «más» de crecimiento rápido en una estructura plana, que después se cierra en un microtúbulo maduro justo detrás de la región de crecimiento. Poco después de la polimerización, el GTP unido a la β-tubulina es hidrolizado en GDP, puesto que la tubulina unida a GDP es menos estable en el microtúbulo, los dímeros del extremo «menos» empiezan a liberarse. El *treadmilling* tiene lugar a concentraciones de dímeros de tubulina intermedias entre las concentraciones críticas para los extremos «más» y «menos». Bajo estas condiciones, existe una disociación neta de dímeros (unidos a GDP) del extremo «menos», equilibrado por la adición de dímeros (unidos a GTP) en el extremo «más».

Al igual que la actina, la polimerización de tubulina puede estudiarse *in vitro*. Los dímeros de tubulina polimerizan para formar microtúbulos, que generalmente consisten en 13 protofilamentos lineares ensamblados alrededor de un centro hueco (Fig. 12.42). Los protofilamentos, que están constituidos por un conjunto de dímeros de tubulina dispuestos cabeza con cola, se disponen en paralelo. Como consecuencia, los microtúbulos (al igual que los filamentos de actina) son estructuras polares con dos extremos diferenciados: un extremo «más» de crecimiento rápido y un extremo «menos» de crecimiento lento. Esta polaridad es un dato importante para determinar la dirección del movimiento a lo largo de los microtúbulos, al igual que la polaridad de los filamentos de actina define la dirección del movimiento de la miosina.

Los dímeros de tubulina pueden despolimerizar al igual que polimerizar, y los microtúbulos pueden sufrir ciclos de ensamblaje y desensamblaje rápidos. Tanto la α-tubulina como la β-tubulina se unen a GTP, que actúa de forma análoga al ATP fijado a la actina para regular la polimerización. Concretamente, el GTP unido a la β-tubulina (no así el GTP fijado a α-tubulina) se hidroliza a GDP durante o justo después de la polimerización. Esta hidrólisis de GTP disminuye la afinidad de la tubulina por las moléculas adyacentes, lo que favorece la despolimerización y tiene como resultado el comportamiento dinámico de los microtúbulos. Al igual que los filamentos de actina, los microtúbulos sufren intercambio rotatorio (Fig. 12.43), un comportamiento dinámico en el que las moléculas de tubulina unidas a GTP se liberan continuamente del extremo «menos» y son reemplazadas por la adición de moléculas de tubulina unida a GTP al extremo «más» del mismo microtúbulo. En los microtúbulos, la hidrólisis de GTP también conduce a un comportamiento que se conoce como **inestabilidad dinámica**, en el que los microtúbulos individuales alternan entre ciclos de crecimiento y de acortamiento (Fig. 12.44). El que un microtúbulo crezca o se acorte viene determinado por la velocidad de adición de la tubulina respecto a la velocidad de hidrólisis del GTP. Mientras las nuevas moléculas de tubulina unidas a GTP se añadan a mayor velocidad que la de hidrólisis del GTP, el microtúbulo mantiene una caperuza de GTP en su extremo «más» y el crecimiento del microtúbulo continúa. Sin embargo, si la velocidad de polimerización decrece, el GTP fijado a la tubulina en el extremo «más» del microtúbulo será hidrolizado a GDP. Si esto ocurre, la tubulina unida a GDP se disociará, dando lugar a una rápida despolimerización y acortamiento del microtúbulo.

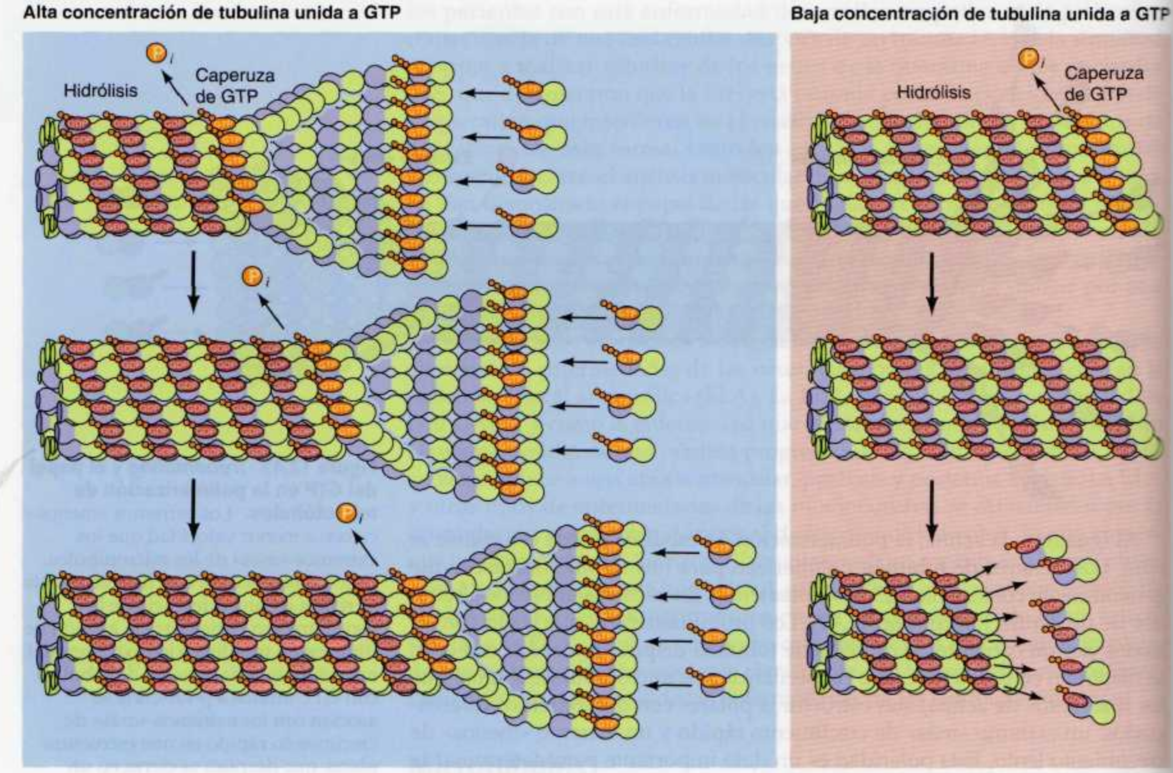


Figura 12.44 Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. La inestabilidad dinámica se debe a la hidrólisis del GTP unido a β-tubulina durante o justo después de la polimerización, que reduce la afinidad por las moléculas adyacentes. El crecimiento de los microtúbulos continúa mientras exista una concentración elevada de tubulina unida a GTP. En este caso las moléculas nuevas de tubulina unidas a GTP se añaden más rápido de lo que el GTP es hidrolizado, por lo que se mantiene una caperuza de GTP en el extremo en crecimiento. Sin embargo, si el GTP se hidroliza más rápidamente de lo que se añaden las nuevas subunidades, la presencia de tubulina unida a GDP en el extremo del microtúbulo lleva al desensamblaje y al acortamiento.

12.3 Animación web

Ensamblaje de microtúbulos

Los dímeros de tubulina pueden polimerizarse al igual que despolimerizarse para formar o deshacer microtúbulos.

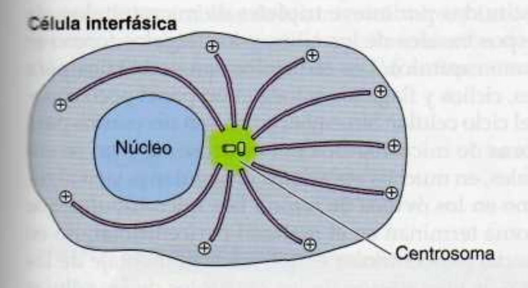
El taxol fue originalmente aislado de la corteza de sauces del Pacífico. El sauce del Pacífico es uno de los árboles de crecimiento más lento y se necesitaron varios árboles para extraer suficiente taxol para tratar a un solo paciente, limitando la disponibilidad del fármaco. Afortunadamente, el taxol y sus derivados se producen ahora de forma económica vía un proceso semisintético en el que un compuesto similar al taxol es extraído de árboles relacionados y modificado químicamente.

La inestabilidad dinámica, descrita por Tim Mitchison y Marc Kirschner en 1984, da lugar a una renovación continua y rápida de la mayor parte de los microtúbulos, que presentan una vida media en la célula de sólo varios minutos. Como se verá más adelante, esta rápida renovación de los microtúbulos es especialmente importante para el remodelado del citoesqueleto que tiene lugar durante la mitosis. Debido al papel central de los microtúbulos en la mitosis, los fármacos que afectan al ensamblaje de los microtúbulos no sólo son útiles como herramientas experimentales en biología celular sino también en el tratamiento del cáncer. La **colchicina** y la **colcemida** son ejemplos de fármacos experimentales empleados comúnmente que se unen a la tubulina e inhiben la polimerización del microtúbulo, bloqueando de esta forma la mitosis. Dos fármacos relacionados (**vincristina** y **vinblastina**) se usan en la quimioterapia del cáncer debido a que inhiben de forma selectiva a las células en rápida división. Otro fármaco utilizado, el **taxol**, estabiliza los microtúbulos en vez de inhibir su ensamblaje. Dicha estabilización también bloquea la división celular, y el taxol se utiliza como agente anticanceroso y como herramienta experimental.

Ensamblaje de microtúbulos

En las células animales, la mayoría de los microtúbulos se extienden hacia fuera desde el centrosoma (descrito por primera vez por Theodor Boveri en 1888), que se localiza junto al núcleo cerca del centro de las células interfásicas (no están en división) (Fig. 12.45). Durante la mitosis, de forma similar, los microtúbulos se extienden a partir de centrosomas duplicados para formar el huso mitótico, que es responsable de la segregación y distribución de los cromosomas a las células hijas. De esta manera, el centrosoma desempeña un papel clave en la organización intracelular de los microtúbulos. Las células vegetales no poseen un centrosoma organizado; en su lugar, los microtúbulos en la mayoría de las plantas se extienden hacia fuera desde el núcleo.

El centrosoma se conoce ahora como un centro organizador de microtúbulos en el que se unen los extremos «menos» de éstos. Sirve como lugar de inicio del ensamblaje de los microtúbulos, que crecerán a partir del centrosoma hacia la periferia de la célula. Esto se puede observar claramente en células que hayan sido tratadas con colcemida para desensamblar sus microtúbulos (Fig. 12.46). Cuando el fármaco se retira, las células se recuperan y pueden verse nuevos microtúbulos creciendo desde el centrosoma. Es importante señalar que el inicio del crecimiento de los microtúbulos en el centrosoma establece la polaridad de los microtúbulos en la célula. Concretamente, los microtúbulos crecen por la adición de tubulina a sus extremos «más», que se extienden desde el centrosoma hacia la periferia celular, de modo que el papel del centrosoma es *iniciar* el crecimiento de los microtúbulos. La proteína clave en el centrosoma es la γ-tubulina, una forma minoritaria de tubulina identificada por primera vez en hongos, que nuclea el ensamblaje de microtúbulos. La γ-tubulina está asociada con ocho o más proteínas diferentes con una estructura en forma de anillo denominado ***complejo del anillo de γ-tubulina.*** *Se cree que actúa como una semilla para* el crecimiento rápido de microtúbulos, evitando el paso limitante de la nucleación. Una vez ensamblados, los microtúbulos pueden ser liberados del centro organizador de microtúbulos para organizarse en otro lugar de la célula. Esto es especialmente evidente en células epiteliales polarizadas o en células nerviosas además de en células de las raíces vegetales durante el



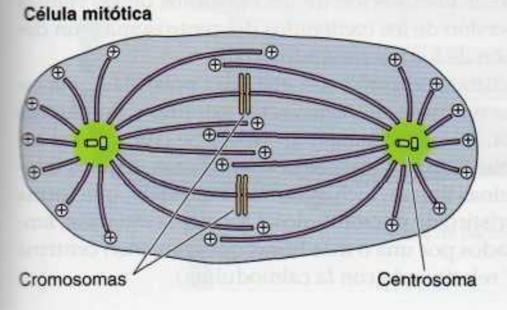


Figura 12.45 Organización intracelular de los microtúbulos. Los extremos «menos» de los microtúbulos se anclan al centrosoma. En las células interfásicas, el centrosoma se localiza cerca del núcleo y los microtúbulos se extienden hacia la periferia celular. Durante la mitosis los centrosomas duplicados se separan y los microtúbulos se reorganizan para formar el huso mitótico.

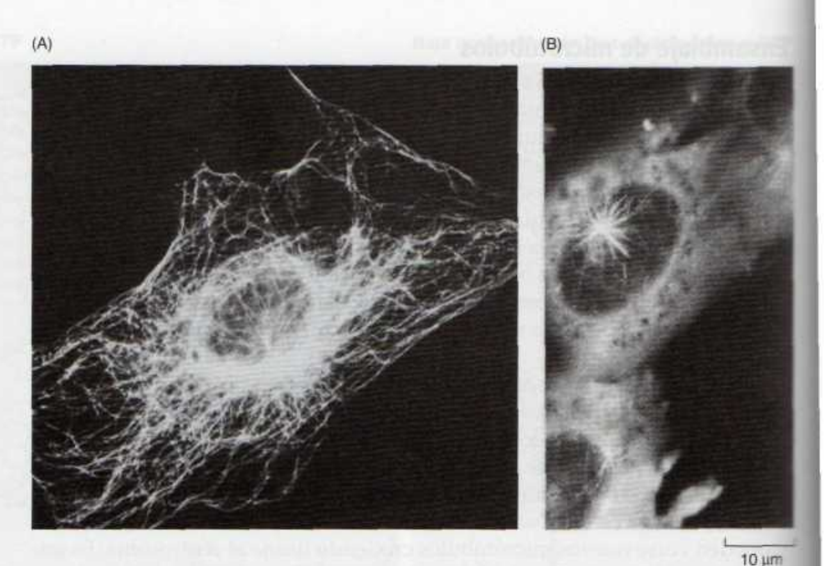
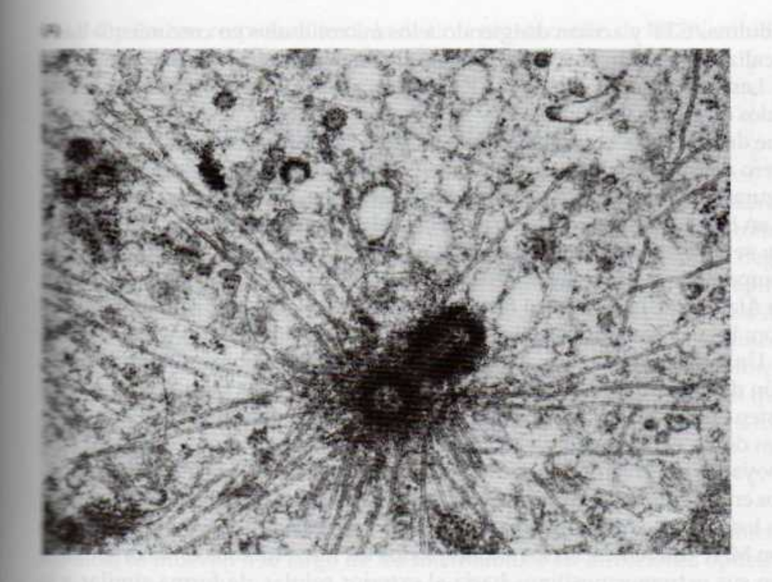


Figura 12.46 Crecimiento de los microtúbulos desde el centrosoma. Los microtúbulos en los fibroblastos de ratón se observan mediante microscopia de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo frente a tubulina. (A) La distribución de los microtúbulos en una célula interfásica normal. (B) Esta célula se trató con colcemida durante una hora para desensamblar los microtúbulos. El fármaco fue entonces retirado y se dejó a la célula recuperarse durante treinta minutos, lo que permitió ver nuevos microtúbulos creciendo desde el centrosoma. (De M. Osborn y K. Weber, 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:867.)

crecimiento de los pelos radiculares. Las células pueden iniciar los microtúbulos en ausencia de un centrosoma porque la γ-tubulina también se encuentra en el citosol, y en la células vegetales la γ-tubulina se concentra en la periferia del núcleo.

Los centrosomas de la mayoría de las células animales están constituidos por un par de **centríolos**, orientados perpendicularmente entre sí, rodeados por un **material pericentriolar** amorfo (Fig. 12.47). Los centríolos son estructuras cilíndricas constituidas por nueve tripletes de microtúbulos, de manera similar a los cuerpos basales de los cilios y los flagelos (como se verá después en este mismo capítulo). Los centríolos son necesarios para formar los cuerpos basales, ciclios y flaglelos, y juegan un papel poco conocido en la coordinación del ciclo celular. Sin embargo no son necesarios para las funciones organizadoras de microtúbulos del centrosoma y no se encuentran en células vegetales, en muchos eucariotas unicelulares, y en algunas células animales (como en los óvulos de ratón). Los microtúbulos que emanan desde el centrosoma terminan en el material pericentriolar, no en los centríolos, y es el material pericentriolar el que inicia el montaje de los microtúbulos. Sin embargo, la eliminación de los centríolos de las células animales resulta en la dispersión de los contenidos del centrosoma y un declive de la tasa de renovación de los microtúbulos.

Los centríolos son estructuras complejas con una clara polaridad, una estructura proteica con forma de rueda de carro en un extremo y numerosas extensiones hacia el interior del centrosoma (Fig. 12.48). Se cree que las extensiones ayudan a organizar la matriz del centrosoma. Los centríolos también contienen varias proteínas únicas, incluyendo la δ-tubulina, que forma parte de un triplete característico de microtúbulos. Durante la interfase, ambos centríolos están conectados por una o más fibras que contienen centrina (una proteína que une Ca^{2+} relacionada con la calmodulina).



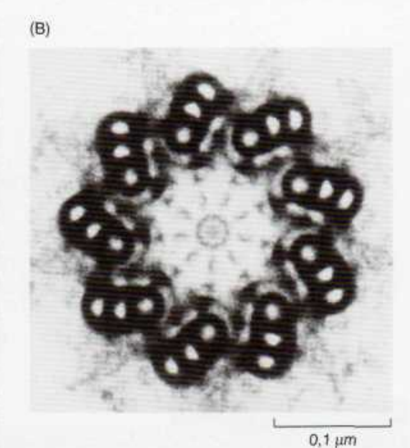


Figura 12.47 Estructura de los centrosomas. (A) Micrografía electrónica de un centrosoma, mostrando los microtúbulos irradiando desde el material pericentriolar que rodea al par de centríolos. (B) Sección transversal de un centríolo mostrando sus nueve tripletes de microtúbulos. (A, © Cytographics; B, Don Fawcett, Photo Researchers, Inc.)

Organización de los microtúbulos en el interior celular

Debido a su inherente inestabilidad, los microtúbulos no modificados deberían desensamblarse de manera frecuente en la célula. Sin embargo, la estabilidad de los microtúbulos se modifica a través de modificaciones postraduccionales amplias de la tubulina y por la interacción de los microtúbulos con **proteínas asociadas a microtúbulos (MAP)**. Las tubulinas α y β son susceptibles de modificación por fosforilación, acetilación, palmitolación, escisión de residuos de tirosina en el extremo carboxilo o adición de varios residuos de glutamina o glicina. Estos cambios posteriores a la traducción afectan directamente a la actividad de los microtúbulos y crean sitios para la unión específica de moléculas de MAP. De manera similar a los microfilamentos, algunas MAP estabilizan a los microtúbulos mediante la adición de caperuzas en sus extremos, mientras que otras provocan el desensamblaje de los microtúbulos, ya sea por medio de su escisión o por aumento de la tasa de despolimerización de tubulina en sus extremos. Varias MAP son proteínas de unión a extremos positivos que se unen a la

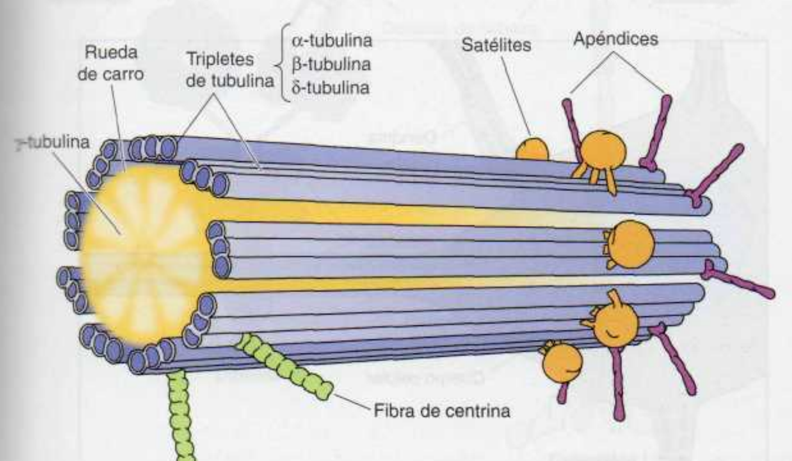


Figura 12.48 Estructura de un centríolo. Los centríolos son estructuras altamente polares con una *estructura proteica en forma de rueda* de carro en un extremo y varios tipos de prolongaciones que se extienden desde el otro extremo. Se cree que estas prolongaciones (denominadas satélites y apéndices) interaccionan con proteínas específicas en la matriz del centrosoma. Otras proteínas de la matriz del centrosoma como la γ-tubulina están asociadas con la luz del centríolo. El triplete de microtúbulos contiene α- y β-tubulinas altamente modificadas y la exclusiva δ-tubulina. Las fibras de centrina se extienden desde los microtúbulos del triplete y se conectan con el otro centríolo. (Modificado a partir de W. F. Marshall, 2001. *Curr. Biol.* 11: R487.)

tubulina/GTP y actúan dirigiendo a los microtúbulos en crecimiento hacia localizaciones celulares específicas, como la membrana plasmática.

Las interacciones con las MAP permiten a la célula estabilizar los microtúbulos de ciertas localizaciones y representan un mecanismo muy importante que determina la morfología y la polaridad celulares. Se conoce un gran número de MAP distintas que varían en función del tipo de célula. Entre ellas figuran MAP-1, MAP-2, *tau* (aislada en neuronas) y MAP-4, que está presente en todos los tipos celulares no neuronales de los vertebrados. La proteína *tau* se ha estudiado con gran detalle debido a que constituye el principal componente de las lesiones cerebrales detectadas en sujetos con enfermedad de Alzheimer. La actividad de muchas MAP se regula mediante la fosforilación, la cual permite a la célula controlar la estabilidad de los microtúbulos.

Un buen ejemplo del papel de los microtúbulos estables en la determinación de la polaridad celular la proporcionan las células nerviosas, que consisten en dos tipos distintos de procesos (axones y dendritas) que se extienden desde el cuerpo celular (Fig. 12.49). Tanto axones como dendritas están apoyados por microtúbulos estables, junto con los neurofilamentos analizados en la sección precedente de este capítulo. Sin embargo, los microtúbulos de los axones y dendritas poseen una organización diferente y se asocian con MAP diferentes. En los axones, todos los microtúbulos están orientados con sus extremos positivos hacia el exterior celular, de forma similar a la orientación de los microtúbulos en otros tipos celulares. Los extremos negativos de la mayoría de los microtúbulos en los axones, sin embargo, no están anclados en el centrosoma, sino que tanto los extremos positivos como los negativos de estos microtúbulos terminan en el citoplasma del axón. En las dendritas, los microtúbulos están orientados en ambas direcciones; algunos extremos positivos se dirigen hacia el cuerpo celular y algunos se dirigen hacia la periferia celular. Estas disposiciones concretas de microtúbulos están acompañadas por diferencias en las MAP: Los axones contienen proteínas *tau*, pero no MAP-2, mientras que las dendritas contienen MAP-2, pero no proteínas *tau*, y parece que estas diferencias en la distribución de

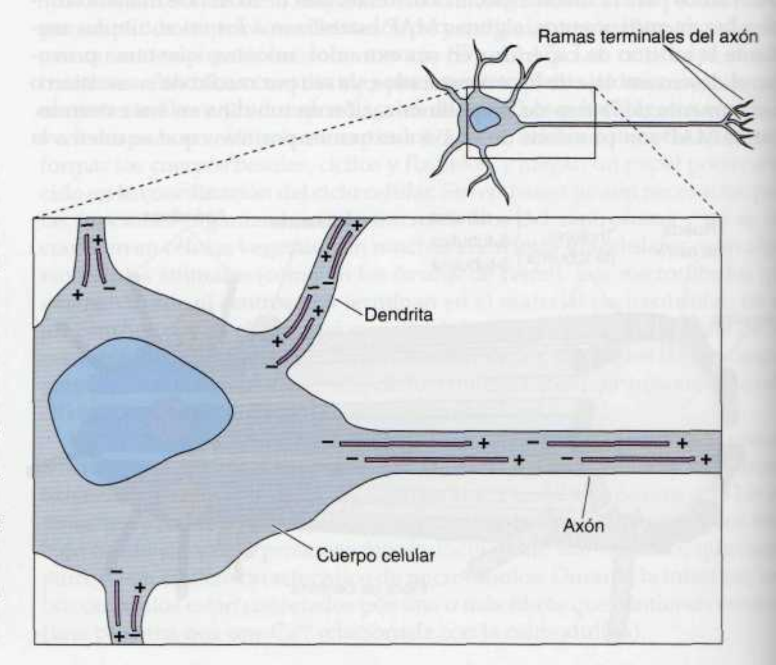


Figura 12.49 Organización de los microtúbulos en las células nerviosas. Dos tipos distintos de prolongaciones se extienden desde el cuerpo celular de las células nerviosas (neuronas). Las dendritas son prolongaciones cortas que reciben estímulos de otras células nerviosas. El único axón largo transmite impulsos desde el cuerpo celular a otras células, que pueden ser bien otras neuronas o bien células efectoras, tales como el músculo. Los microtúbulos estables tanto en los axones como en las dendritas terminan en el citoplasma en vez de unirse al centrosoma. En las dendritas, los microtúbulos se orientan en ambas direcciones, con sus extremos «más» apuntando tanto hacia el cuerpo celular como hacia el sentido contrario. Por el contrario, todos los microtúbulos de los axones se orientan con sus extremos «más» apuntando hacia el final del axón.

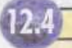
MAP-2 y *tau* son responsables de la distinta organización de los microtúbulos estables de axones y dendritas.

Motores microtubulares y movimientos

Los microtúbulos son responsables de diversos movimientos celulares, incluyendo el transporte intracelular y el posicionamiento de las vesículas de membrana y de los orgánulos, la protrusión de los axones de las neuronas, la separación de los cromosomas en la mitosis y el batir de los cilios y flagelos. Como se vio anteriormente para los filamentos de actina en este capítulo, tiene lugar a través de dos vías: la polimerización y la despolimerización de los microtúbulos se basa en la acción de proteínas motoras que utilizan energía derivada de la hidrólisis de ATP para producir fuerza y movimiento. Los miembros de dos grandes familias de proteínas motoras —las **quinesinas** y las **dineínas**— son los responsables de impulsar los diversos movimientos en los que participan los microtúbulos.

Identificación de las proteínas motoras microtubulares

La quinesina y la dineína, los prototipos de proteínas motoras de los microtúbulos, se mueven a lo largo de los microtúbulos en direcciones opuestas —la quinesina hacia el extremo «más» y la dineína hacia el extremo «menos» (Fig. 12.50)—. La primera de estas proteínas motoras microtubulares que se identificó fue la dineína, que la aisló Ian Gibbons en 1965. La purificación de esta forma de dineína (denominada **dineína axonémica**) se vio facilitada porque es una proteína muy abundante en los cilios, al igual que la abundancia de miosina facilitó que se aislara a partir de las células musculares. Sin embargo, costó más identificar otros motores microtubulares debido a que las proteínas responsables de procesos como el movimiento de los cromosomas y el transporte de los orgánulos se presentan a concentraciones relativamente bajas en el citoplasma. El aislamiento de estas proteínas dependió del desarrollo de nuevos métodos experimentales para detectar la actividad de los motores moleculares en medios libres de células.



Animación web

Quinesina

La quinesina es una proteína motora que desplaza vesículas y orgánulos hacia los extremos positivos de los microtúbulos.

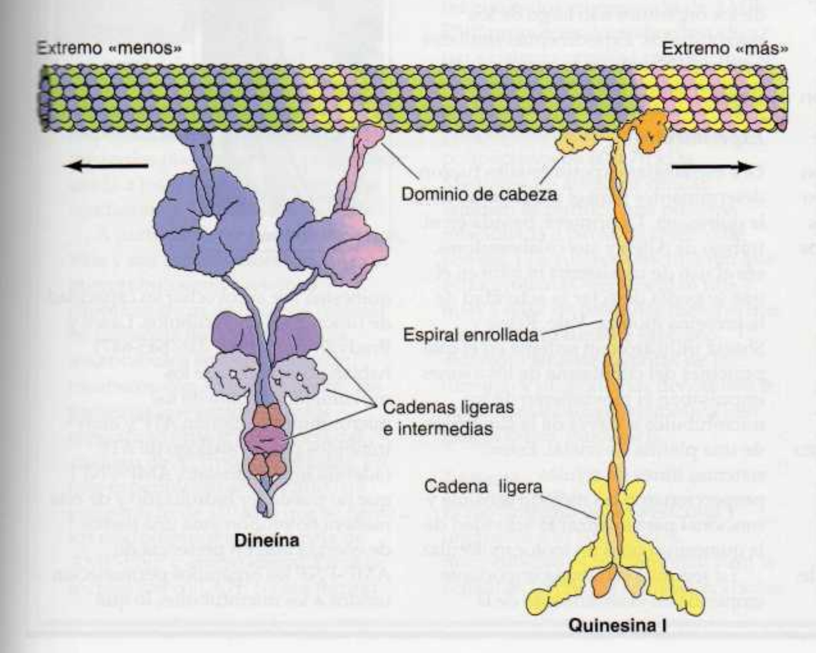


Figura 12.50 Proteínas motoras microtubulares. La quinesina y la dineína migran en direcciones opuestas a lo largo de los microtúbulos, hacia los extremos «más» y «menos», respectivamente. La quinesina I consta de dos cadenas pesadas, enrolladas una sobre la otra en una estructura de hélice enrollada, y de dos cadenas ligeras. Los dominios de cabeza globular de las cadenas pesadas se fijan a los microtúbulos y son los dominios motores de la molécula. La dineína está constituida por dos o tres cadenas pesadas (aquí se muestran dos) asociadas a varias cadenas ligeras e intermedias. Los dominios de cabeza globular de las cadenas pesadas son los dominios motores. Los modelos mostrados están basados en datos recientes obtenidos por cristalografía de rayos X. (R. D. Vale, 2003. *Cell* 112:467.)

El desarrollo de los ensayos *in vitro* para las proteínas motoras citoplasmáticas se basó en la utilización de la **microscopia vídeo-amplificada**, desarrollada por Robert Allen y Shinya Inoué a principios de los años 80, para estudiar el movimiento de las vesículas de membrana y de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos en los axones de calamar. En este método se utiliza una cámara de vídeo para aumentar el contraste de las imágenes obtenidas con un microscopio óptico, lo que mejora sustancialmente la detección de objetos pequeños y permite que se pueda seguir el movimiento de los orgánulos en las células vivas. Utilizando este abordaje, Allen, Scott Brady y Ray Lasek demostraron que el movimiento de los orgánulos también puede tener lugar en un sistema libre de células en el que se haya retirado la membrana plasmática y se haya extendido un extracto citoplasmático en una platina de cristal. Estas observaciones condujeron al desarrollo de



EXPERIMENTO CLAVE

Aislamiento de la quinesina

Identificación de una nueva proteína generadora de fuerza, la quinesina, implicada en la movilidad basada en microtúbulos

Ronald D. Vale, Thomas S. Reese y Michael P. Sheetz

National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, Narine Biological Laboratory, Woods Hole, MA; University of Connecticut Health Center, Farmington, CT; Stanford University School of Medicine, Stanford, CA

Cell, Volumen 42, 1985, págs. 39-50


R. D. Vale
T. S. Reese
M. P. Sheetz

Contexto

El transporte y posicionamiento de los orgánulos citoplasmáticos es un hecho clave en la organización de las células eucariotas, por lo que comprender los mecanismos responsables del transporte de las vesículas y orgánulos es una cuestión fundamental en biología celular. En 1982, Robert Allen, Scott Brady, Ray Lasek y sus colaboradores emplearon la microscopia amplificada por vídeo para visualizar el movimiento de los orgánulos a lo largo de los filamentos citoplasmáticos en los axones gigantes de calamar, tanto *in vivo* como en un sistema de libre de células. Estos filamentos se identificaron como microtúbulos mediante microscopia electrónica, pero se desconocían las proteínas motoras responsables del movimiento de los orgánulos: el único motor microtubular identificado hasta ese momento era la dineína axonémica, que estaba presente solamente en cilios y flagelos. En 1985, Ronald Vale, Thomas Reese y Michael Sheetz describieron el aislamiento de una proteína motora nueva, la quinesina, que era responsable del movimiento de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos. Experimentos similares fueron publicados a la vez por Scott Brady (*Nature*, 1985, 317: 73-75).

Experimentos

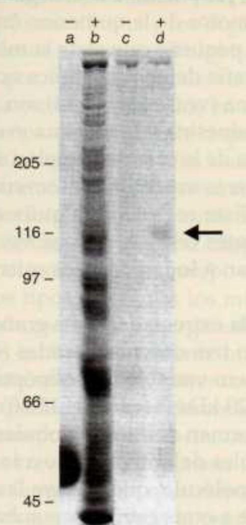
Dos estrategias experimentales fueron determinantes para el aislamiento de la quinesina. La primera, basada en el trabajo de Allen y sus colaboradores, era el uso de un sistema *in vitro* en el que se podía detectar la actividad de la proteína motora. Vale, Reese y Sheetz utilizaron un sistema en el que proteínas del citoplasma de los axones impulsaban el movimiento de los microtúbulos a través de la superficie de una platina de cristal. Estos sistemas libres de células proporcionaron un método sensible y funcional para analizar la actividad de la quinesina como un motor molecular.

La segunda estrategia importante empleada en el aislamiento de la quinesina fue aprovechar su capacidad de unión a los microtúbulos. Lasek y Brady (*Nature*, 1985, 316: 645-647) habían observado que los movimientos *in vitro* de los microtúbulos requerían ATP y eran inhibidos por un análogo de ATP (adenilil imidodifosfato, AMP-PNP) que no puede ser hidrolizado y de esta manera no proporciona una fuente de energía útil. En presencia de AMP-PNP los orgánulos permanecían unidos a los microtúbulos, lo que

un sistema reconstruido *in vitro*, que proporcionó un método capaz de detectar proteínas celulares responsables del movimiento de los orgánulos. En 1985 Brady, junto con Ronald Vale, Thomas Reese y Michael Sheetz, se basaron en estas innovaciones para identificar la quinesina (conocida actualmente como quinesina «convencional» o quinesina I) como una nueva proteína motora de los microtúbulos, presente tanto en los axones de sepia como en el cerebro bovino.

Estudios posteriores demostraron que la quinesina I se desplaza a lo largo de los microtúbulos en una única dirección —hacia el extremo «más»—. Debido a que los extremos «más» de los microtúbulos en los axones están todos orientados hacia fuera del cuerpo celular (véase Fig. 12.49), el movimiento de la quinesina en esta dirección transporta las vesículas y orgánulos hacia fuera del cuerpo celular, hacia el final del axón. Sin embargo, en axones in-

EXPERIMENTO CLAVE



Fijación de una proteína motora a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP. Se analizaron muestras de proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida, que se tiñó y fotografió. El peso molecular de las proteínas marcadoras se indica a la izquierda en kilodaltons. La columna «a» representa microtúbulos purificados, en la que sólo se detecta tubulina (55 kDa). La columna «b» es un extracto soluble de citoplasma de axón de calamar, conteniendo muchos polipéptidos diferentes. Se incubó este extracto soluble con microtúbulos tanto sin AMP-PNP (columna *c*) como con él (columna *d*). Se recuperaron los microtúbulos y se incubaron con ATP para liberar las proteínas fijadas, las cuales fueron sometidas a electroforesis. Nótese que un polipéptido de 110 kDa estaba unido específicamente a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP y después se liberó por ATP. También se encontró que las proteínas unidas en presencia de AMP-PNP y liberadas por ATP inducían el movimiento de los microtúbulos (indicado por «+» sobre el gel).

sugería que la proteína motora responsable del movimiento de los orgánulos podría también permanecer unida a los microtúbulos bajo estas condiciones.

A partir de estos descubrimientos, Vale y sus colaboradores incubaron microtúbulos con proteínas citoplasmáticas de axón de calamar en presencia de AMP-PNP. Los microtúbulos se recuperaron e incubaron con ATP para liberar las proteínas que estaban unidas específicamente en presencia del análogo de ATP no hidrolizable. En este experimento se identificó un polipéptido de 110 kDa que se fijaba a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP y que se liberaba tras la incubación con ATP (véase figura). Además, las proteínas unidas a los microtúbulos y después liberadas por ATP también mantenían el movimiento de los microtúbulos *in vitro*. Por tanto, la unión a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP proporcionó un abordaje eficaz para aislar la proteína motora, que se mostró por estudios bioquímicos posteriores que contenía el polipéptido de 110 kDa unido a polipéptidos de 60 a 70 kDa. Mediante un abordaje similar, también se purificó una proteína relacionada a partir de cerebro de bovino. Los autores concluyeron que estas proteínas «representan una nueva clase de proteínas motoras que son estructuralmente así como enzimáticamente distintas de la dineína, y proponemos denominar a estos translocadores quinesina (del griego *kinein*, moverse)».

Impacto

El movimiento de las vesículas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos es fundamental para la organización de las células eucariotas, por lo que las proteínas motoras responsables de estos movimientos desempeñan un papel crítico en la biología celular. Experimentos posteriores empleando modelos *in vitro* similares a los descritos aquí establecieron que la quinesina se desplaza a lo largo de los microtúbulos en dirección al extremo «más», mientras que la dineína citoplasmática es la responsable del transporte de vesículas y orgánulos en la dirección del extremo «menos» de los microtúbulos. Más aún, desde entonces se ha identificado una gran familia de proteínas relacionadas con la quinesina. Además de su papel en el transporte de las vesículas y orgánulos, los miembros de estas familias de proteínas motoras son responsables de la separación y distribución de los cromosomas durante la mitosis. Por tanto, la identificación de la quinesina abrió la puerta para comprender diversos movimientos basados en los microtúbulos que resultan claves para la estructura y función de las células eucariotas.

tactos también se ha observado que las vesículas y orgánulos migran hacia el interior del cuerpo celular, lo que implica que una proteína motora distinta podría ser la responsable del movimiento a lo largo de los microtúbulos en la dirección opuesta —hacia el extremo «menos»—. De acuerdo con esta suposición, estudios posteriores mostraron que una proteína previamente identificada como la proteína asociada a microtúbulos MAP-1C era de hecho una proteína motora que se desplazaba a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo «menos». Posteriores análisis demostraron que la MAP-1C está relacionada con la dineína aislada a partir de los cilios (dineína axonémica), por lo que la MAP-1C ahora se denomina **dineína citoplasmática**.

La quinesina I es una molécula de aproximadamente 380 kDa, constituida por dos cadenas pesadas (120 kDa cada una) y dos cadenas ligeras (de 64 kDa cada una) (véase Fig. 12.50). Las cadenas pesadas tienen regiones largas de α-hélice que se enrollan una alrededor de la otra en una estructura de hélice enrollada. Los dominios de cabeza globular amino-terminales de las cadenas pesadas son los dominios motores de la molécula: se unen tanto a los microtúbulos como al ATP, cuya hidrólisis proporciona la energía necesaria para el movimiento. Aunque el dominio motor de la quinesina (aproximadamente 340 aminoácidos) es mucho más pequeño que el de la miosina (alrededor de 850 aminoácidos), la cristalografía de rayos X indica que los dominios motores de la quinesina y la miosina (véase Fig. 12.33) son similares estructuralmente, lo que sugiere que la quinesina y la miosina evolucionaron a partir de un ancestro común. La zona de la cola de la molécula de quinesina está constituida por las cadenas ligeras unidas a los dominios carboxilo-terminales de las cadenas pesadas. Esta región de la quinesina es la responsable de la unión a otros componentes celulares (como vesículas de membrana y orgánulos) que se transportan a lo largo de los microtúbulos por la acción de los motores de quinesina.

La dineína citoplásmica es una molécula extremadamente grande (hasta 2.000 kDa), que está constituida por dos o tres cadenas pesadas (cada una alrededor de 500 kDa) unida con un número variable de polipéptidos ligeros e intermedios, que oscilan entre 14 y 120 kDa (véase Fig. 12.50). Al igual que en la quinesina, las cadenas pesadas forman dominios globulares motores de unión a ATP que son los responsables del movimiento a lo largo de los microtúbulos. La porción basal de la molécula, que incluye las cadenas ligeras e intermedias, se piensa que se une a otras estructuras subcelulares, como orgánulos y vesículas. En muchas situaciones la dineína citoplásmica actúa junto con una proteína denominada **dinactina** para transportar mercancías a través de largas distancias sobre los microtúbulos.

Como sucede con las miosinas, tanto la quinesina como la dineína definen familias de proteínas motoras relacionadas. Tras aislarse inicialmente la quinesina en 1985, se han identificado varias proteínas relacionadas con la quinesina. El genoma de C. *elegans* codifica 45 quinesinas diferentes y hay cuarenta y cinco quinesinas conocidas en el ser humano. La mayoría de éstas, como quinesina I, se mueven a lo largo de los microtúbulos en dirección al extremo positivo (véase Fig. 12.50). Otras quinesinas se mueven en la dirección opuesta hacia el extremo negativo, y tres quinesinas no se mueven sobre los microtúbulos en absoluto, pero emplean sus propiedades de unión a la tubulina para anclar los microtúbulos a otras estructuras (estudiado más adelante). Existe una correlación directa entre dónde se encuentra el dominio motor en la molécula y la dirección del movimiento a lo largo del microtúbulo; las quinesinas que se dirigen al extremo positivo poseen dominios motores N-terminales, las quinesinas que se dirigen al extremo negativo poseen dominios motores C-terminales, y aquellas que no se desplazan a lo largo de los microtúbulos poseen dominios motores en el centro de la cadena pesada (quinesinas de motor céntrico). Los distintos

miembros de la familia quinesina varían en las secuencias de sus colas carboxilo-terminales y son responsables de los movimientos de diferentes tipos de «mercancías» sobre los microtúbulos. Existen al menos dos tipos de dineínas citoplásmicas y varios tipos de dineínas axonémicas. Mientras que todos los miembros de la familia dineína se desplazan hacia los extremos negativos de los microtúbulos, dineínas citoplásmicas diferentes pueden transportar mercancías diferentes. Se cree que ciertas dineínas y quinesinas son capaces de reconocer distintos microtúbulos al detectar las modificaciones post-traduccionales de las moléculas de tubulina.

Transporte de mercancías y organización intracelular

Una de las funciones principales de los microtúbulos es transportar macromoléculas, vesículas de membrana y orgánulos a través del citoplasma de las células eucariotas. Como ya se ha visto, dicho transporte de orgánulos citoplasmáticos resulta evidente en los axones de las células nerviosas, que pueden extenderse más de un metro de longitud. Los ribosomas sólo se localizan en el cuerpo celular y en las dendritas, por lo que las proteínas, las vesículas de membrana y los orgánulos (p. ej., mitocondrias) han de transportarse desde el cuerpo celular hasta el axón. Mediante la microscopia amplificada por vídeo se puede visualizar el transporte de las vesículas de membrana y de los orgánulos en ambas direcciones a lo largo de los microtúbulos de los axones, donde la quinesina y la dineína llevan sus cargas hasta y desde los extremos de los axones, respectivamente. Por ejemplo, las vesículas secretoras que contienen neurotransmisores se transportan desde el aparato de Golgi hasta las ramas terminales del axón por la quinesina. En la dirección opuesta, la dineína citoplasmática transporta vesículas endocíticas desde el axón hacia el cuerpo celular.

En otros tipos de células los microtúbulos transportan macromoléculas, vesículas de membrana y orgánulos de forma similar. Debido a que los microtúbulos están generalmente orientados con sus extremos «menos» unidos al centrosoma y sus extremos «más» extendiéndose hacia la periferia celular, se piensa que los diferentes miembros de las familias de quinesina y dineína transportan mercancía, las vesículas y los orgánulos en direcciones opuestas a través del citoplasma (Fig. 12.51). La quinesina I y otros miembros de la familia de la quinesina que se dirigen hacia el extremo «más», transportan su carga hacia la periferia celular, mientras que las dineínas citoplasmáticas y los miembros de la familia de la quinesina que se dirigen hacia el extremo «menos» transportan los materiales hacia el centro de la célula. La selección de la mercancía puede ser muy específica. La quinesina II, un motor dirigido al extremo positivo, transporta los ARNm seleccionados hacia la corteza celular en ovocitos de *Xenopus*, un proceso que parece ser

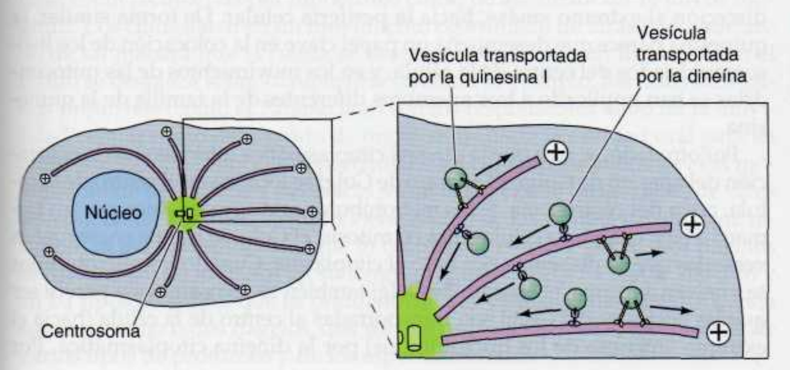
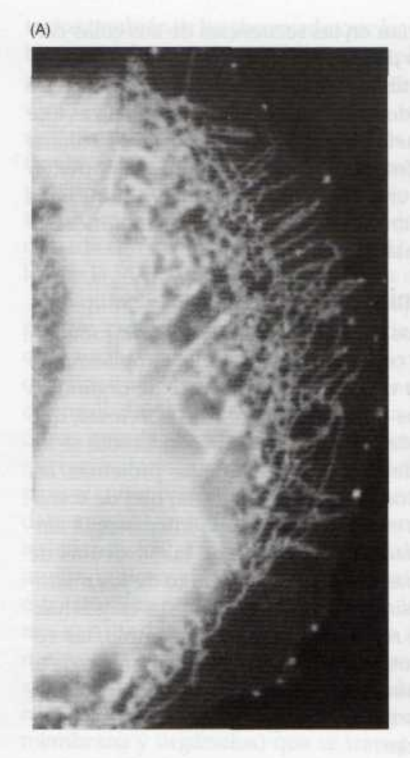


Figura 12.51 Transporte de las vesículas a lo largo de los microtúbulos. La quinesina I y otros miembros de la familia de la quinesina dirigidos hacia el extremo «más», transportan vesículas y orgánulos en dirección a los extremos «más» de los microtúbulos, que se extienden hacia la periferia celular. Por el contrario, la dineína y los miembros de la familia de la quinesina dirigidos al extremo «menos», transportan sus cargas en dirección a los extremos «menos» de los microtúbulos, que se encuentran unidos en el centro de la célula.



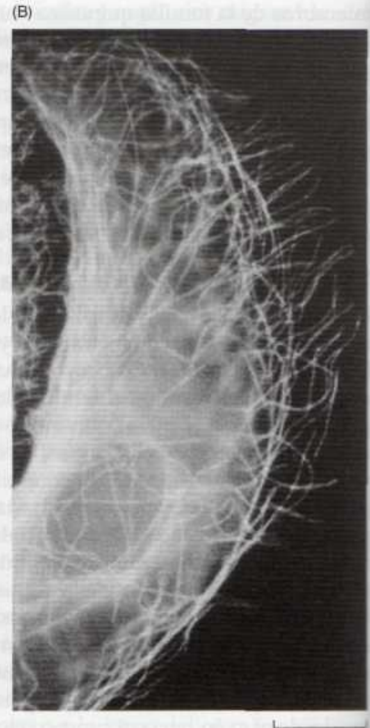


Figura 12.52 Asociación del retículo endoplasmático con los microtúbulos. Microscopia de fluorescencia del retículo endoplasmático (A) y de microtúbulos (B) en una célula epitelial. El retículo endoplasmático se ha teñido con un tinte fluorescente y los microtúbulos con un anticuerpo contra la tubulina. Obsérvese la estrecha relación entre el retículo endoplasmático y los microtúbulos en la periferia de la célula. (De M. Terasaki, L. B. Chen y K. Fujiwara, 1986. *J. Cell Biol.* 103: 1557.)

general para todos los vertebrados. La quinesina I de forma similar transporta actina en el embrión de *Drosophila*.

Además de transportar vesículas de membrana en las vías endocíticas y secretoras, los microtúbulos y proteínas motoras asociadas posicionan los orgánulos encerrados por membranas (como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, lisosomas y las mitocondrias) en el interior celular. Por ejemplo, el retículo endoplasmático se extiende a la periferia celular en asociación con los microtúbulos (Fig. 12.52). Los fármacos que despolimerizan los microtúbulos provocan que el retículo endoplasmático se retraiga hacia el centro de la célula, lo que indica que se requiere la asociación con los microtúbulos para mantener al retículo endoplasmático en su estado extendido. Esta colocación del retículo endoplasmático parece requerir la acción de la quinesina (o posiblemente múltiples miembros de la familia de la quinesina), que tira del retículo endoplasmático a lo largo de los microtúbulos en dirección al extremo «más», hacia la periferia celular. De forma similar, la quinesina parece que desempeña un papel clave en la colocación de los lisosomas alejados del centro de la célula, y en los movimientos de las mitocondrias se han implicado a tres miembros diferentes de la familia de la quinesina.

Por otro lado, se cree que la *dineína citoplasmática* interviene en la colocación del aparato de Golgi. El aparato de Golgi se localiza en el centro de la célula, cerca del centrosoma. Si los microtúbulos se disgregan, bien por un fármaco o bien cuando la célula entra en mitosis, el Golgi se rompe en pequeñas vesículas que se dispersan por todo el citoplasma. Cuando los microtúbulos se vuelven a formar, el aparato de Golgi también se reensambla, y parece ser que las vesículas del Golgi son transportadas al centro de la célula (hacia el extremo «menos» de los microtúbulos) por la dineína citoplasmática. Por

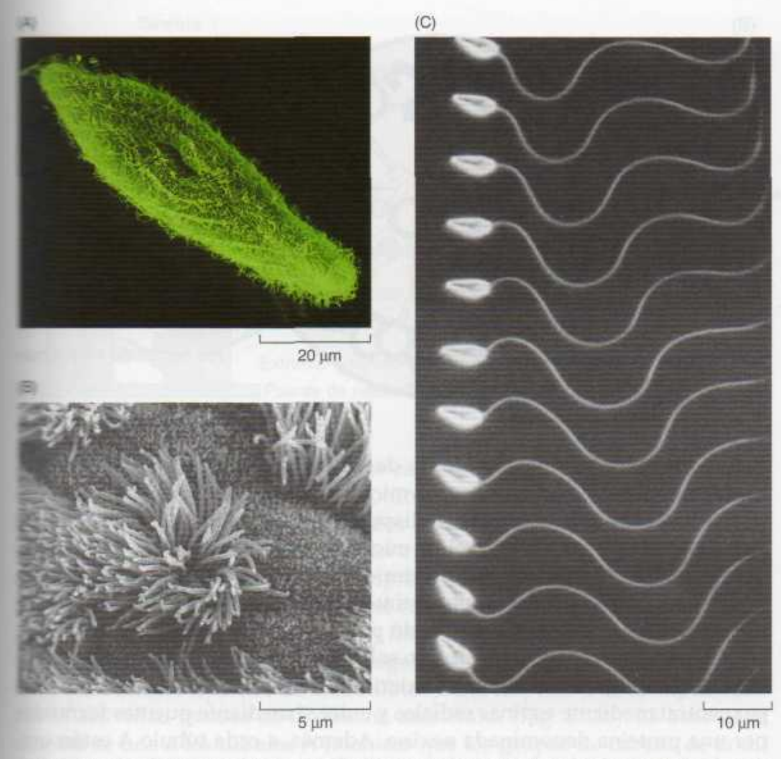


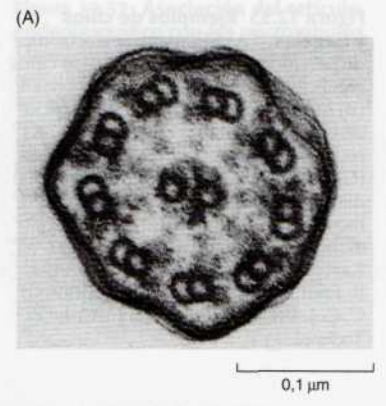
Figura 12.53 Ejemplos de cilios y flagelos. (A) Micrografía electrónica de barrido mostrando numerosos cilios recubriendo la superficie de *Paramecium*. (B) Micrografía electrónica de barrido de células epiteliales ciliadas recubriendo la superficie de la tráquea. (C) Fotografía de disparo múltiple (500 disparos por minuto) mostrando el movimiento ondulatorio de un flagelo de espermatozoide de erizo de mar. (A, Karl Aufderheide/Visuals Unlimited; B, Fred E. Hossler/Visuals Unlimited; C, C. J. Brokaw, California Institute of Technology.)

tanto, el movimiento a lo largo de los microtúbulos es responsable no sólo del transporte de vesículas, sino también de estabilizar la posición de los orgánulos con membrana en el citoplasma de las células eucariotas.

Cilios y flagelos

Los **cilios** y **flagelos** son prolongaciones de la membrana plasmática constituidas por microtúbulos, responsables del movimiento de varios tipos de células eucariotas. Los cilios aparecen en un mayor número de tipos celulares, ya que se encuentran en casi todas las células animales. Muchas bacterias también poseen flagelos pero estos flagelos procariotas son bastante diferentes de los eucariotas. Los flagelos bacterianos (que no se van a tratar) son filamentos proteicos que se proyectan desde la superficie celular, en vez de prolongaciones de la membrana plasmática sostenidas por microtúbulos.

Los cilios y los flagelos eucarióticos son estructuras muy similares, cada una con un diámetro de 0,25 µm, aproximadamente (Fig. 12.53). Muchas células están recubiertas por numerosos cilios, de alrededor de 10 µm de longitud. Los cilios baten en un movimiento coordinado de atrás hacia adelante, de tal manera que la célula se desplaza a través de un fluido o bien el fluido se desplaza sobre la superficie celular. Por ejemplo, los cilios de algunos protozoos (como el *Paramecium*) son los responsables tanto de la movilidad celular como del barrido de organismos hacia la cavidad oral para su alimentación. Una función importante de los cilios en los animales es el movimiento de los fluidos y del *mucus* sobre la superficie de las capas de células epiteliales. Un buen ejemplo viene dado por las células ciliadas que recubren el tracto respiratorio, que lo limpian de *mucus* y polvo. Los flagelos se diferencian de los cilios en su longitud (pueden llegar a medir 200 µm) y en su tipo de batido, que es ondulatorio. Las células generalmente tienen solamente uno o dos flagelos, que son los responsables de la locomoción de varios tipos de protozoos y de los espermatozoides.



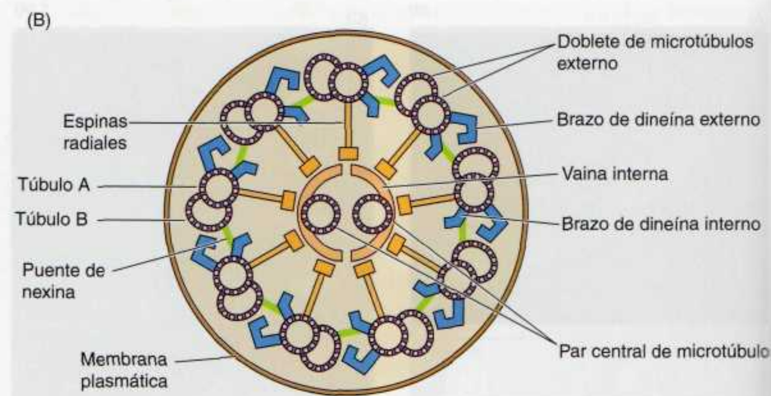


Figura 12.54 Estructura del axonema de cilios y flagelos. (A) Micrografía electrónica tratada por ordenador de una sección transversal del axonema de un flagelo de espermatozoide de rata. (B) Esquema de una sección transversal de un axonema. Los nueve dobletes de microtúbulos externos formados por un túbulo A completo, que contiene 13 protofilamentos, y un túbulo incompleto B, que contiene 10 u 11 protofilamentos. Los dobletes externos se unen entre sí por puentes de nexina y al par central de microtúbulos mediante espinas radiales. Cada doblete de microtúbulos externo está unido a brazos de dineína internos y externos. (A, K. G. Murti/Visuals Unlimited.)

La estructura fundamental tanto de los cilios como de los flagelos es el **axonema**, que está constituido por microtúbulos y sus proteínas asociadas (Fig. 12.54). Los microtúbulos se disponen en un patrón característico de «9 + 2» en el que un par central de microtúbulos se encuentra rodeado por nueve dobletes de microtúbulos exteriores. Los dos microtúbulos fusionados de cada doblete exterior son distintos: uno (denominado el túbulo A) es un microtúbulo completo constituido por 13 protofilamentos; el otro (el túbulo B) está incompleto, constituido solamente por 10 u 11 protofilamentos unidos al túbulo A. Los dobletes exteriores de microtúbulos se conectan al par central mediante espinas radiales y entre sí mediante puentes formados por una proteína denominada **nexina**. Además, a cada túbulo A están unidos dos brazos de dineína, y es la actividad motora de estas dineínas axonémicas la que dirige el batido de los cilios y flagelos.

Los extremos «menos» de los microtúbulos de los cilios y flagelos están unidos a un **cuerpo basal** que tiene una estructura similar a la del centríolo y que contiene nueve tripletes de microtúbulos (Fig. 12.55). Vimos anteriormente que los centríolos eran componentes del centrosoma, sin que su fun-



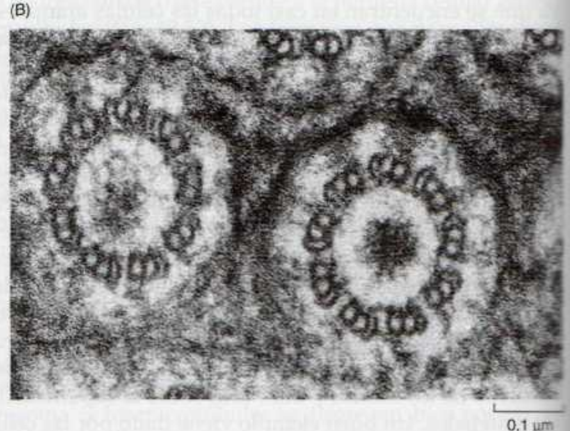


Figura 12.55 Micrografías electrónicas de los cuerpos basales. (A) Vista longitudinal de cilios anclados en los cuerpos basales. (B) Sección transversal de cuerpos basales. Cada cuerpo basal está constituido por nueve tripletes de microtúbulos. (A, Conly L. Reider/Biological Photo Service; B, W. L. Dentler, Biological Photo Service.)

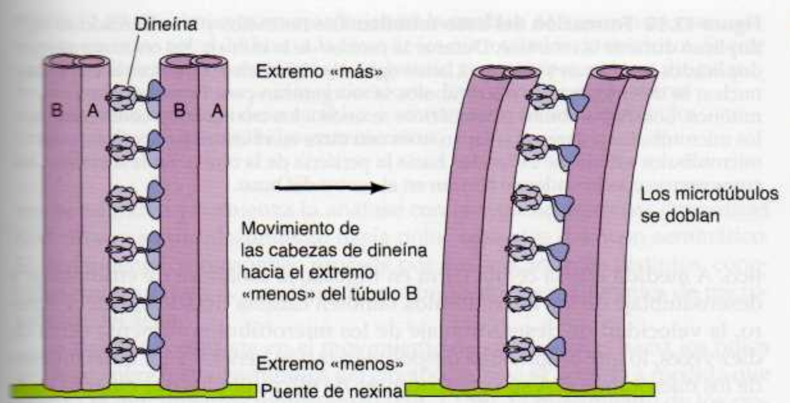


Figura 12.56 Movimiento de los microtúbulos en los cilios y flagelos. Las bases de los brazos de dineína se unen a *los túbulos* A, y las cabezas motoras interaccionan con los túbulos B de los dobletes adyacentes. El movimiento de las cabezas de dineína hacia el extremo «menos» (hacia la base del cilio) provoca entonces que el túbulo A de un doblete se deslice hacia la base del túbulo B adyacente. Debido a que ambos dobletes de microtúbulos están conectados por puentes de nexina, este movimiento de deslizamiento les obliga a doblarse.

ción estuviera clara. Sin embargo, los cuerpos basales tienen un papel definido en la organización de los microtúbulos del axonema. Los cuerpos basales provienen de cilios transportados hacia la membrana plasmática. Los dobletes de microtúbulos externos del axonema se forman por extensión de dos de los microtúbulos de cada triplete del cuerpo basal. Por tanto, los cuerpos basales sirven para iniciar el crecimiento de los microtúbulos del axonema, además de anclar a cilios y flagelos a la superficie de la célula.

Los movimientos de los cilios y flagelos se producen por el deslizamiento de los dobletes externos de microtúbulos uno respecto a otro, impulsados por la actividad motora de la dineína axonémica (Fig. 12.56). La base de la dineína se une a los túbulos A mientras que los grupos de cabeza de la dineína se unen a los túbulos B de los dobletes adyacentes. El movimiento del grupo de cabeza de la dineína hacia el extremo «menos» provoca que el túbulo A de un doblete se deslice hacia el extremo basal del túbulo B adyacente. Debido a que los dobletes de microtúbulos en un axonema están unidos por puentes de nexina, el deslizamiento de un doblete sobre otro hace que se doblen, lo que constituye la base del movimiento de batido de cilios y flagelos. Sin embargo, está claro que las actividades de las moléculas de dineína en regiones diferentes del axonema se deben regular cuidadosamente para producir el batido coordinado de los cilios y las oscilaciones ondulatorias de los flagelos —un proceso del que todavía se conoce muy poco.

Reorganización de los microtúbulos durante la mitosis

Como ya se comentó, los microtúbulos se reorganizan completamente durante la mitosis, lo que proporciona un claro ejemplo de la importancia de su inestabilidad dinámica. El conjunto de microtúbulos presente en las células interfásicas se disgrega y las subunidades libres de tubulina se reensamblan para formar el **huso mitótico**, responsable de la segregación de los cromosomas hijos (Fig. 12.57). Esta reestructuración del citoesqueleto de microtúbulos es dirigida por la duplicación del centrosoma para formar dos centros organizadores de microtúbulos, separados en polos opuestos del huso mitótico.

Los centríolos y otros componentes del centrosoma se duplican en las células interfásicas, pero permanecen juntos a un lado del núcleo hasta el comienzo de la mitosis (Fig. 12.58). Entonces se separan los dos centrosomas y migran a lados opuestos del núcleo, formando los dos polos del huso mitó-

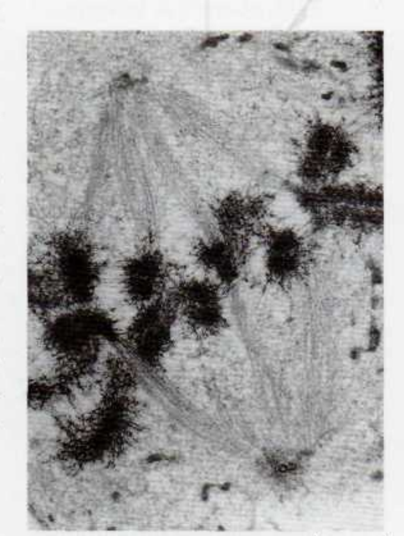


Figura 12.57 Micrografía electrónica del huso mitótico. Los microtúbulos del huso se unen a los cromosomas condensados en la metafase. (De C.L. Rieder y S.S. Bowser, 1985. *J. Histochem. Cytochem.* 33:165/ Biological Photo Service.)

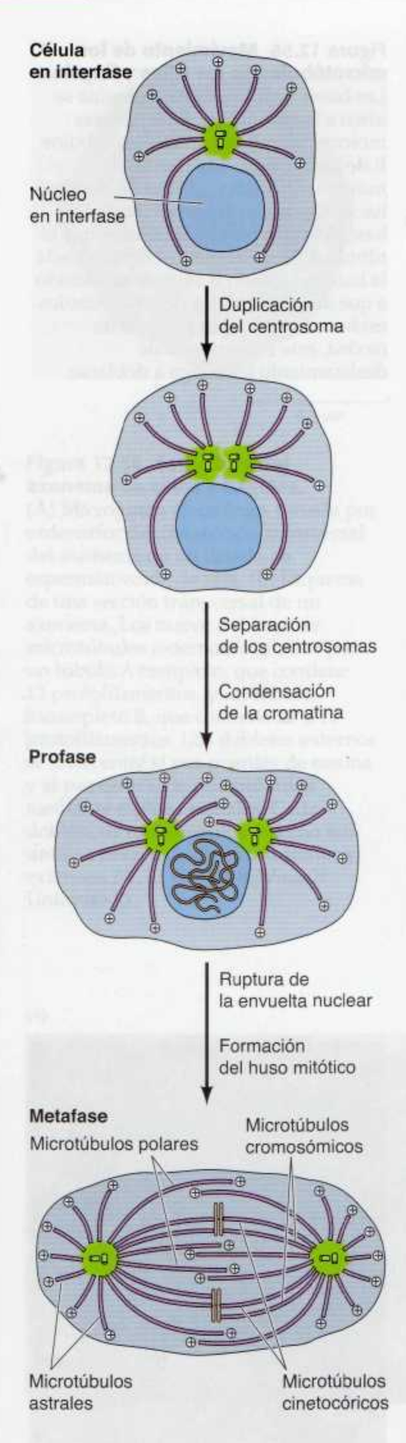


Figura 12.58 Formación del huso mitótico. Los centríolos y los centrosomas se duplican durante la interfase. Durante la profase de la mitosis, los centrosomas duplicados se separan y migran a lados opuestos del núcleo. Entonces la envuelta nuclear se desintegra y los microtúbulos se reorganizan para formar el huso mitótico. Los microtúbulos cinetocóricos se unen a los cromosomas condensados, los microtúbulos polares se solapan unos con otros en el centro de la célula, y los microtúbulos astrales se extienden hacia la periferia de la célula. En la metafase, los cromosomas condensados se alinean en el centro del huso.

tico. A medida que la célula entra en mitosis, la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos también cambia drásticamente. Primero, la velocidad de desensamblaje de los microtúbulos aumenta cerca de diez veces, lo que origina una despolimerización general y un acortamiento de los microtúbulos. A su vez, el número de microtúbulos que emana desde el centrosoma aumenta entre cinco y diez veces. En suma, estos cambios producen el desensamblaje de los microtúbulos interfásicos y el crecimiento de un gran número de microtúbulos cortos a partir de los centrosomas.

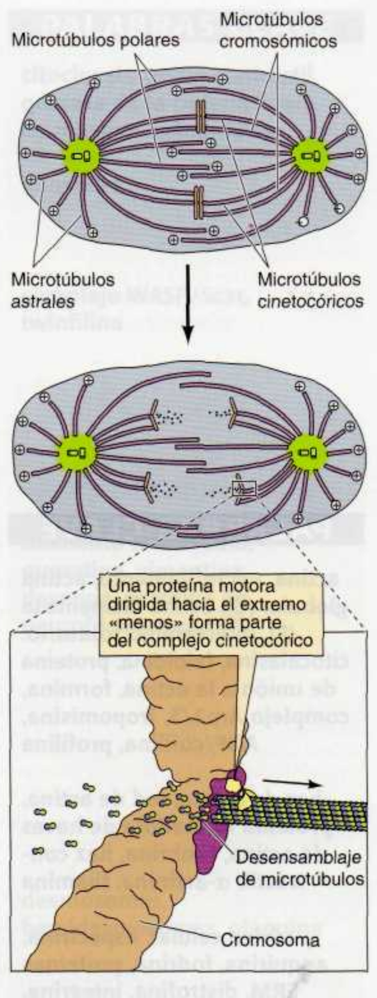
Como propusieron por primera vez Marc Kirschner y Tim Mitchison en 1986, la formación del huso mitótico implica la estabilización selectiva de algunos de los microtúbulos que irradian desde el centrosoma. Estos microtúbulos son de tres tipos, dos de los cuales componen el huso mitótico. Los **microtúbulos cinetocóricos** se unen a los cromosomas condensados de las células mitóticas en sus centrómeros, que están asociados con proteínas específicas para formar el cinetocoro (véase Fig. 5.19). La fijación al cinetocoro estabiliza a estos microtúbulos, los cuales, como se verá después, desempeñan un papel crítico en la segregación de los cromosomas mitóticos. También se encuentran emanando de los centrosomas los **microtúbulos cromosómicos**, que conectan con los extremos de los cromosomas vía la cromoquinesina. El tercer tipo de microtúbulos que se encuentran en el huso mitótico (**microtúbulos polares**) no se unen a los cromosomas. Por el contrario, los microtúbulos polares que emanan desde los dos centrosomas se estabilizan al solaparse uno sobre otro en el centro de la célula. Los **microtúbulos astrales** se extienden desde los centrosomas hacia la periferia de la célula con sus extremos «más» libres. Como se tratará posteriormente, tanto los microtúbulos astrales como los polares contribuyen también al movimiento de los cromosomas al separar los polos del huso.

Según transcurre la mitosis, los cromosomas condensados primero se alinean en la placa metafásica y luego se separan, tirando de las dos cromátidas de cada cromosoma hacia polos opuestos del huso. Proteínas motoras asociadas con los microtúbulos del huso intervienen en el movimiento de los cromosomas, como se describe a continuación. En la etapa final de la mitosis se vuelve a formar la envuelta nuclear, los cromosomas se descondensan, y tiene lugar la citocinesis. Cada célula hija contiene entonces un centrosoma que dirige la formación de una nueva red de microtúbulos interfásicos.

Movimiento cromosómico

Después de que los dos centrosomas se han desplazado a extremos opuestos de la célula al principio de la mitosis, los cromosomas duplicados se unen al cinetócoro y a los microtúbulos cromosómicos, y se alinean en la fase metafásica, equidistantes de ambos polos. Esta alineación de cromosomas está mediada por un crecimiento rápido de los microtúbulos del cinetócoro y la captura de cinetócoros por parte de las proteínas que se dirigen a los extremos positivos. Adicionalmente, los extremos cromosómicos son empujados hacia la placa metafásica por la cromoquinesina que se desplaza sobre los microtúbulos cromosómicos. Una vez que todos los cromosomas se han alineado en la placa metafásica, las uniones entre cromátidas herma-

Figura 12.59 Movimiento cromosómico en la anafase A. Los cromosomas migran hacia los polos del huso a lo largo de los microtúbulos cinetocóricos. Se cree que el movimiento cromosómico está controlado por proteínas motoras dirigidas hacia el extremo «menos» unidas al cinetocoro. La acción de estas proteínas motoras está acoplada al desensamblaje y acortamiento de los microtúbulos cinetocóricos y los microtúbulos cromosómicos.



nas se escinden y comienza la anafase con la separación de las cromáticas hermanas y su desplazamiento hacia polos opuestos del huso acromático. El movimiento cromosómico procede por dos mecanismos distintos, conocidos como **anafase A** y **anafase B**, que implican tipos diferentes de microtúbulos del áster.

La anafase A consiste en el movimiento de cromosomas hacia los polos del áster sobre los microtúbulos del cinetócoro, que se acortan a medida que avanza el movimiento cromosómico (Fig. 12.59). El movimiento de los cromosomas sobre los microtúbulos del huso acromático en dirección a los extremos negativos (hacia los centrosomas) está dirigido por las proteínas motoras asociadas al cinetócoro. La dineína citoplásmica está asociada con los cinetócoros y puede jugar un papel en el desplazamiento hacia los polos, al igual que los miembros de la familia quinesina que se dirigen a los extremos negativos. La acción de estas proteínas motoras del cinetócoro está acoplada al desensamblaje y acortamiento de los microtúbulos tanto del cinetócoro como cromosómicos, que está mediado por las quinesinas de motor céntrico que actúan como enzimas despolimerizantes de los microtúblos.

La anafase B se refiere a la separación de los polos del huso acromático en sí (Fig. 12.60). La separación de los polos del huso acromático está acom-

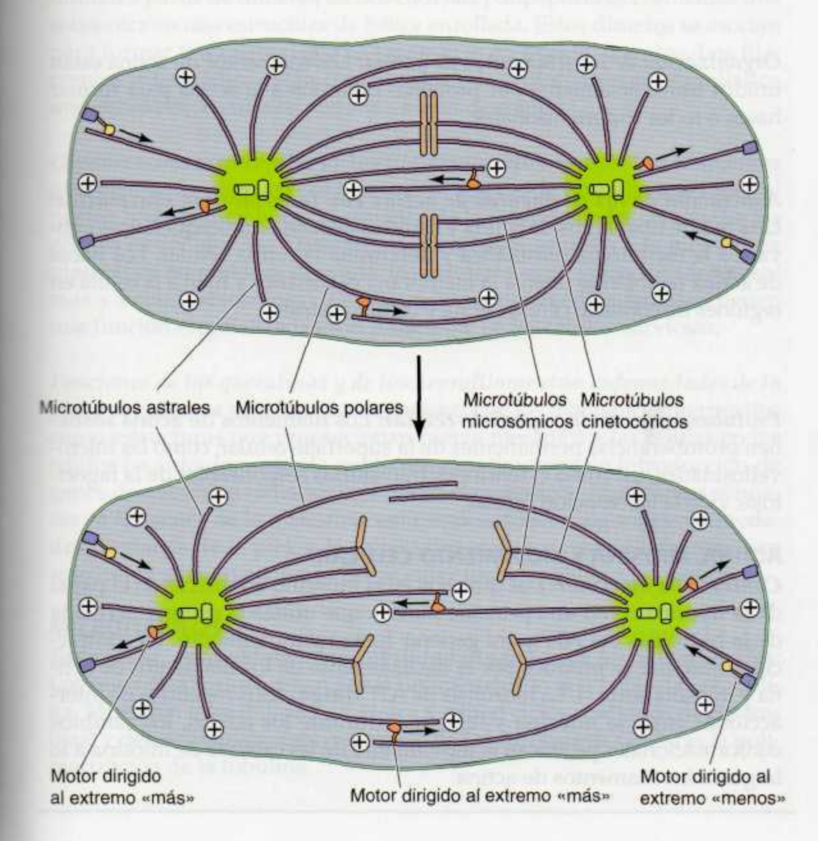


Figura 12.60 Separación de los polos del huso en la anafase B. La separación de los polos del huso se produce por dos tipos de movimientos. Primero, los microtúbulos polares solapados deslizan unos sobre otros empujando y separando los polos del huso, probablemente como resultado de la acción de proteínas motoras dirigidas hacia el extremo «más». En segundo lugar, los microtúbulos astrales tiran de los polos del huso y los separan. La fuerza conductora podría ser un motor dirigido hacia el extremo «menos», fijado a una estructura citoplasmática, como el córtex celular.

pañada por la elongación de los microtúbulos polares y es similar a la separación inicial de los centrosomas duplicados para formar los polos del huso al principio de la mitosis (véase Fig. 12.58). Durante la anafase B los microtúbulos polares solapantes se deslizan unos sobre otros, separando los polos del huso. Este tipo de movimiento se ha demostrado que resulta de la acción de varias quinesinas de dirección positiva, que forman enlaces cruzados con los microtúbulos y los desplazan alejándolos del polo del huso acromático. Adicionalmente, los polos del huso son separados por los microtúbulos astrales. Este tipo de movimiento implica la acción de la dineína citoplásmica anclada a la corteza celular. El movimiento de esta dineína anclada sobre los microtúbulos astrales en dirección al extremo negativo separa a los polos del huso hacia la periferia celular. Existe una despolimerización simultánea de los microtúbulos astrales por parte de las quinesinas de motor céntrico, dando lugar a la separación de los polos del huso acromático y su desplazamiento hacia la periferia celular, antes de la formación de las dos células hijas al final de la mitosis.

PALABRAS CLAVE

actina, microfilamento, actina globular (G), actina filamentosa (F), intercambio rotatorio, citocalasina, faloidina, proteína de unión a la actina, formina, complejo Arp2/3, tropomisina, ADF/cofilina, profilina

haz de actina, red de actina, proteína formadora de haces de actina, fimbrina, haz contráctil, α-actinina, filamina

córtex celular, espectrina, anquirina, fodrina, proteínas ERM, distrofina, integrina, adhesión focal, fibra de estrés, talina, vinculina, unión adherente, cinturón de adhesión, cadherina, cateninas

microvellosidad, borde en cepillo, estereocilio, villina, pseudópodo, lamelipodio, microespina, filopodio

miosina, motor molecular, fibra muscular, miofibrilla, sarcómero, titina, nebulina, modelo de deslizamiento de los filamentos, miosina II, retículo sarcoplásmico, troponina

RESUMEN

ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA

Ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina: Los filamentos de actina se forman por la polimerización cabeza-cola de los monómeros de actina, dando lugar a una hélice. Varias proteínas de unión a la actina regulan el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos dentro de la célula.

Organización de los filamentos de actina: Los filamentos de actina están unidos transversalmente por proteínas de unión a la actina para formar haces o redes tridimensionales.

Asociación de los filamentos de actina con la membrana plasmática: Una red de filamentos de actina y de otras proteínas citoesqueléticas subyace a la membrana plasmática y determina la forma celular. Los haces de actina también se unen a la membrana plasmática y fijan a la célula en regiones de contacto célula-célula y célula-sustrato.

Protuberancias de la superficie celular: Los filamentos de actina sostienen protuberancias permanentes de la superficie celular, como las microvellosidades, así como extensiones transitorias responsables de la fagocitosis y de la locomoción celular.

ACTINA, MIOSINA Y MOVIMIENTO CELULAR

Contracción muscular: Los estudios en el músculo establecieron el papel de la miosina como una proteína motora que utiliza la energía derivada de la hidrólisis del ATP para generar fuerza y movimiento. La contracción muscular se produce por el deslizamiento de los filamentos de actina y miosina entre sí. La hidrólisis de ATP dirige ciclos repetidos de interacciones entre la miosina y la actina, durante los cuales, los cambios conformacionales provocan el movimiento de las cabezas de miosina a lo largo de los filamentos de actina.

RESUMEN

Asociaciones contráctiles de actina y miosina en células no musculares: Asociaciones de actina y miosina II son las responsables de diversos movimientos en las células no musculares, incluyendo la citocinesis.

Miosinas no musculares: Otros tipos de miosina que no actúan en la contracción sirven para el transporte de vesículas de membrana y orgánulos a lo largo de los filamentos de actina.

Formación de extensiones y movimiento celular: La formación de extensiones celulares está mediada por el crecimiento de múltiples ramas de filamentos de actina en el frente de avance de la célula. El movimiento celular es un proceso complejo en el que se forman adhesiones en los extremos de las nuevas extensiones celulares, el cuerpo celular es arrastrado hacia delante mediante la acción de la miosina II sobre las fibras de estrés, y el extremo de arrastre se retrae hacia el cuerpo celular.

FILAMENTOS INTERMEDIOS

Proteínas de filamentos intermedios: Los filamentos intermedios son polímeros de más de 50 proteínas diferentes que se expresan en varios tipos de células. No están implicados en el movimiento celular pero crean un armazón en el que pueden tener lugar diversos procesos celulares y proporcionan apoyo mecánico a las células y tejidos.

Ensamblaje de filamentos intermedios: Los filamentos intermedios se forman a partir de dímeros de dos cadenas polipeptídicas enrolladas una sobre otra en una estructura de hélice enrollada. Estos dímeros se asocian para formar tetrámeros, que se ensamblan en protofilamentos. Los filamentos intermedios están constituidos por protofilamentos enrollados uno sobre otro en una estructura a modo de cuerda.

Organización intracelular de los filamentos intermedios: Los filamentos intermedios forman una red que se extiende desde un anillo que rodea al núcleo hasta la membrana plasmática de la mayoría de las células. En las células epiteliales los filamentos intermedios se unen a la membrana plasmática en regiones de contactos celulares especializados (desmosomas y hemidesmosomas). Los filamentos intermedios también tienen una función especializada en el músculo y en las células nerviosas.

Funciones de las queratinas y de los neurofilamentos: enfermedades de la piel y del sistema nervioso: La importancia de los filamentos intermedios como estructuras que proporcionan fuerza mecánica a las células en los tejidos ha sido demostrada mediante experimentos de introducción de genes de queratina mutados en ratones transgénicos. Mutaciones similares en los genes de la queratina son responsables de algunas enfermedades humanas de la piel, y las alteraciones de los neurofilamentos han sido implicadas en el desarrollo de enfermedades en las motoneuronas.

MICROTÚBULOS

Estructura, ensamblaje e inestabilidad dinámica de los microtúbulos: Los microtúbulos se forman por la polimerización reversible de la tubulina. Muestran inestabilidad dinámica y sufren ciclos continuos de ensamblaje y desensamblaje como resultado de la hidrólisis de GTP tras la polimerización de la tubulina.

PALABRAS CLAVE

citocinesis, anillo contráctil, quinasa de la cadena ligera de miosina, calmodulina

miosina I

complejo WASP/Scar, twinfilina

filamento intermedio, queratina, vimentina, desmina, proteína de neurofilamentos (NF)

desmosomas, hemidesmosomas, plaquina

microtúbulo, tubulina, inestabilidad dinámica, colchicina, colcemida, vincristina, vinblastina, taxol

PALABRAS CLAVE	RESUMEN
centrosoma, complejo del anillo de γ-tubulina, centríolo, material pericentriolar	*Ensamblaje de microtúbulos:* En la mayoría de las células los microtúbulos se extienden desde un centro organizador de microtúbulos, o centrosoma, localizado cerca del centro de la célula. En las células animales el centrosoma generalmente está constituido por un par de centríolos rodeados por el material pericentriolar. El crecimiento de los microtúbulos se inicia en el material pericentriolar, que así sirve para anclar sus extremos «menos».
proteína asociada a microtúbulos (MAP)	*Organización de los microtúbulos en el interior celular:* La estabilización selectiva de los microtúbulos por modificación post-traduccional de la tubulina y la unión de proteínas asociadas a microtúbulos puede determinar la forma y la polaridad celular, así como la extensión de axones y dendritas de las células nerviosas.
	MOTORES MICROTUBULARES Y MOVIMIENTOS
quinesina, dineína, dineína axonémica, microscopia vídeo amplificada, dineína citoplasmática, dinactina	*Identificación de proteínas motoras microtubulares:* Dos familias de proteínas motoras, las quinesinas y las dineínas, son las responsables del movimiento a lo largo de los microtúbulos. La quinesina y la mayoría de las proteínas relacionadas con la quinesina se desplazan en dirección al extremo «más», mientras que las dineínas y algunos miembros de la familia de la quinesina se mueven hacia los extremos «menos» de los microtúbulos.
	Transporte de mercancías y organización intracelular: El movimiento a lo largo de los microtúbulos transporta vesículas de membrana y orgánulos a través del citoplasma, al igual que coloca los orgánulos citoplasmáticos en la célula.
cilio, flagelo, axonema, nexina, cuerpo basal	*Cilios y flagelos:* Los cilios y flagelos son extensiones de la membrana plasmática mantenidas por microtúbulos. Sus movimientos se producen por el deslizamiento de los microtúbulos, dirigido por la acción de motores de dineína.
huso acromático, microtúbulo cinetocórico, microtúbulo cromosómico, microtúbulo polar, microtúbulo astral	*Reorganización de microtúbulos durante la mitosis:* Los microtúbulos se reorganizan al principio de la mitosis para formar el huso acromático, que es responsable de la separación cromosómica.
anafase A, anafase B	*Movimiento cromosómico:* Los cromosomas duplicados se alinean sobre la placa metafásica. Durante la anafase de la mitosis, los cromosomas hijos se separan y migran a polos opuestos del huso mitótico. La separación cromosómica se produce por varios tipos de movimientos en los que participan distintas clases de microtúbulos del huso y proteínas motoras.

Preguntas

1. ¿Por qué los filamentos de actina poseen una marcada polaridad? ¿Por qué es la polaridad de los filamentos de actina importante para la contracción muscular?
2. ¿Qué es el intercambio rotatorio (*treadmilling*) y a qué concentración de monómeros se produce?
3. ¿Cómo afectarían la citocalasina y la faloidina al *treadmilling* de los filamentos de actina?
4. ¿Cómo regulan el ensamblaje y renovación de filamentos de actina la ADF/cofilina, la profilina y el complejo Arp2/3?
5. ¿Qué bandas o zonas de un sarcómero muscular modifican la longitud durante la contracción? ¿Por qué la banda A no cambia de longitud?
6. ¿Cómo regula el Ca^{2+} la contracción de las células del músculo liso?
7. ¿Cómo afectaría la expresión de siARN dirigidos frente a la vimentina al crecimiento de fibroblastos en cultivo?
8. ¿Por qué los filamentos intermedios apolares, aunque se ensamblen a partir de monómeros, poseen extremos diferentes?
9. ¿Qué observación clave ayudó a Vale y colaboradores a diseñar una estrategia para el aislamiento de la quinesina?
10. ¿Cómo afectaría al movimiento de los cilios la eliminación de la nexina?
11. Estás estudiando el transporte de vesículas secretoras que contienen insulina a lo largo de los microtúbulos en un cultivo de células pancreáticas. ¿Cómo afectaría el tratamiento con colcemida al transporte de estas vesículas?
12. ¿Cuál es la función celular de la γ-tubulina?

Bibliografía

Referencias generales

Bray, D. 2001. *Cell Movements*, 2nd ed., New York: Garland Publishing.

Schliwa, M. and G. Woehlke. 2003. Molecular motors. *Nature* 422: 759–765. [R]

Estructura y organización de los filamentos de actina

Bamburg, J. R. and O. P. Wiggan. 2002. ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* 12: 598–605. [R]

Bennett, V. and D. M. Gilligan. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9: 27–66. [R]

Blessing, C. A., G. T. Ugrinova and H. V. Goodson. 2004. Actin and ARPs: Action in the nucleus. *Trends Cell Biol.* 14: 435–442. [R]

Campbell, K. P. 1995. Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675–679. [R]

Dominguez, R. 2004. Actin-binding proteins—a unifying hypothesis. *Trends Biochem. Sci.* 29: 572–578. [R]

Erickson, H. P. 2007. Evolution of the cytoskeleton. *Bioessays* 29: 668–677. [R]

Goode, B. L. and M. J. Eck. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 593–627. [R]

Gunning, P. W., G. Schevzov, A. J. Kee and E. C. Hardeman. 2005. Tropomyosin isoforms: Divining rods for actin cytoskeleton function. *Trends Cell Biol.* 15: 333–341. [R]

Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard and W. Kabsch. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347: 44–49. [P]

Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* 347: 37–44. [P]

Kandasamy, M. K., R. B. Deal, E. C. McKinney and R. B. Meagher. 2004. Plant actin-related proteins. *Trends Plant Sci.* 9: 196–202. [R]

Khurana, S. and S. P. George. 2008. Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: Villin's perspective. *FEBS Lett.* 582: 2128–2139. [R]

Paavilainen, V. O., E. Bertling, S. Falck and P. Lappalainen. 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 14: 386–394. [R]

Pollard,T. D. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36: 451–477. [R]

Rèvenu, C., R. Athman, S. Robine and D. Louvard. 2004. The co-workers of actin filaments: From cell structures to signals. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 635–646. [R]

Wear, M. A. and J. A. Cooper. 2004. Capping protein: New insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem. Sci.* 29: 418–428. [R]

Witke, W. 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* 14: 461–469. [R]

Zigmond, S. H. 2004. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 99–105. [R]

Actina, miosina y movimiento celular

Berg, J. S., B. C. Powell and R. E. Cheney. 2001. A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* 12: 780–794. [R]

Buss, F., G. Spudich and J. Kendrick-Jones. 2004. MYOSIN VI: Cellular functions and motor properties. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 649–676. [R]

Carragher, N. O. and M. C. Frame. 2004. Focal adhesion and actin dynamics: A place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol.* 14: 241–249. [R]

Charest, P. G. and R. A. Firtel. 2007. Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem. J.* 401: 377–390. [R]

Finer, J. T., R. M. Simmons and J. A. Spudich. 1994. Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* 368: 113–119. [P]

Frank, D. J., T. Noguchi and K. G. Miller. 2004. Myosin VI: A structural role in actin organization important for protein and organelle localization and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 189–194. [R]

Geeves, M. A. and K. C. Holmes. 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 687–728. [R]

Huxley, A. F. and R. Niedergerke. 1954. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173: 971–973. [P]

Huxley, H. E. 1969. The mechanism of muscle contraction. *Science* 164: 1356–1366. [R]

Huxley, H. E. and J. Hanson. 1954. Changes in the cross-striations of muscle contraction and their structural interpretation. *Nature* 173: 973–976. [P]

Janmey, P. A. and U. Lindberg. 2004. Cytoskeletal regulation: Rich in lipids. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 658–666. [R]

Manes, S. and A. Martinez. 2004. Cholesterol domains regulate the actin cytoskeleton at the leading edge of moving cells. *Trends Cell Biol.* 14: 275–278. [R]

Myers, K. R. and J. E. Casanova. 2008. Regulation of actin cytoskeleton dynamics by Arf-family GTPases. *Trends Cell Biol.* 18: 184–192.

Nayal, A., D. J. Webb and A. F. Horwitz. 2004. Talin: An emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 94–98. [R]

Paavilainen,V. O., E. Bertling, S. Falck and P. Lappalainen. 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 14: 386–394. [R]

Pak, C. W., K. C. Flynn and J. R. Bamburg. 2008. Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nature Rev. Neurosci.* 9: 136–147. [R]

Raftopoulou, M. and A. Hall. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* 265: 23–32. [R]

Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Kolmes and R. A. Milligan. 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261: 58–65. [P]

Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg and H. M. Holden. 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science* 261: 50–58. [P]

Revenu, C., R. Athman, S. Robine and D. Louvard. 2004. The co-workers of actin filaments: From cell structures to signals. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 635–646. [R]

Schafer, D. A. 2004. Cell biology: Barbed ends rule. *Nature* 430: 734–735. [R]

Stradal, T. E., K. Rottner, A. Disanza, S. Confalonieri, M. Innocenti and G. Scita. 2004. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14: 303–311. [R]

Takenawa, T. and S. Suetsugu. 2007. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 37–48. [R]

Tan, J. L., S. Ravid and J. A. Spudich. 1992. Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 721–759. [R]

Witke, W. 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* 14: 461–469. [R]

Filamentos intermedios

Brown, R. H., Jr. 1995. Amyotrophic lateral sclerosis: Recent insights from genetics and transgenic mice. *Cell* 80: 687–692. [R]

Coulombe, P. A., M. E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A. S. Paller and E. Fuchs. 1991. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: Genetic and functional analyses. *Cell* 66: 1301–1311. [P]

Coulombe, P. A. and M. B. Omary. 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 110–122. [R]

Epstein, E. H., Jr., J. M. Bonifas, and A. L. Rothman, 1991. Epidermolysis bullosa simplex: Evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* 254: 1202–1205. [P]

Fuchs, E. and D. W. Cleveland. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279: 514–519. [R]

Fuchs, E. and S. Raghavan. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Rev. Genet.* 3: 199–209. [R]

Fuchs, E. and Y. Yang. 1999. Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell* 98: 547–550. [R]

Graumann, P. L. 2007. Cytoskeletal elements in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 61: 589–618. [R]

Herrmann, H. and U. Aebi. 2004. Intermediate filaments: Molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 749–789. [R]

Herrmann, H., H. Bar, L. Kreplak, S. V. Strelkov and U. Aebi. 2007. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 562–573. [R]

Hyder, C. L., H. M. Pallari, V. Kochin and J. E. Eriksson. 2008. Providing cellular signposts Post-translational modifications of intermediate filaments. *FEBS Lett.* 582: 2140–2148. [R]

Schwarz, M. A., K. Owaribe, J. Kartenbeck and W. W. Franke. 1990. Desmosomes and hemidesmosomes: Constitutive molecular components. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 461–491. [R]

Vassar, R., P. A. Coulombe, L. Degenstein, K. Albers and E. Fuchs. 1991. Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64: 365–380. [P]

Microtúbulos

Bieling, P., L. Laan, H. Schek, E. L. Munteanu, L. Sandblad, M. Dogterom, D. Brunner and T. Surrey. 2007. Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system *in vitro*. *Nature* 450: 1100–1105. [P]

Bornens, M. 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 25–34. [R]

Dogterom, M., J. W. Kerssemakers, G. Romet-Lemonne and M. E. Janson. 2005. Force generation by dynamic microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 67–74. [R]

Hammond, J. W., D. Cai and K. J. Verhey. 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 71–76. [R]

Hays, T. and M. Li. 2001. Kinesin transport: Driving kinesin in the neuron. *Curr. Biol.* 11: R136–R139. [R]

Job, D., O. Valiron and B. Oakley. 2003. Microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 111–117. [R]

Karsenti, E. and I. Vernos. 2001. The mitotic spindle: A self-made machine. *Science* 294: 543–547. [R]

Lüders, J. and T. Stearns. 2007. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 161–167. [R]

Mandelkow, E. and E.-M. Mandelkow. 2002. Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol.* 12: 585–591. [R]

Mitchison, T. and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237–242. [P]

Nogales, E., M. Whittaker, R. A. Milligan and K. H. Downing. 1999. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96: 79–88. [P]

Oakley, B. R., C. E. Oakley, Y. Yoon and M. K. Jung. 1990. γ-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61: 1289–1301. [P]

Osborn, M. and K. Weber. 1976. Cytoplasmic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 867–871. [P]

Siegrist, S. E. and C. Q. Doe. 2007. Microtubule-induced cortical cell polarity. *Genes Dev.* 21: 483–496. [R]

Verhey, K. J. and J. Gaertig. 2007. The tubulin code. *Cell Cycle* 6: 2152–2160. [R]

Zheng, Y., M. L. Wong, B. Alberts and T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a γ-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378: 578–583. [P]

Motores microtubulares y movimientos

Asbury, C. L. 2005. Kinesin: World's tiniest biped. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 89–97. [R]

Betley, J. N., B. Heinrich, I. Vernos, C. Sardet, F. Prodon and J. O. Deshler. 2004. Kinesin II mediates Vg1 mRNA transport in *Xenopus* oocytes. *Curr. Biol.* 14: 219–224. [P]

Brady, S. T. 1985. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal motor. *Nature* 317: 73–75. [P]

Brady, S. T., R. J. Lasek and R. D. Allen. 1982. Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science* 218: 1129–1131. [P]

Desai, A., S. Verma, T. J. Mitchison and C. E. Walczak. 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 96: 69–78. [P]

Gibbons, I. R. and A. Rowe. 1965. Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* 149: 424–426. [P]

Hammond, J. W., D. Cai and K. J. Verhey. 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 71–76. [R]

Holzbaur, E. L. 2004. Motor neurons rely on motor proteins. *Trends Cell Biol.* 14: 233–240. [R]

Koonce, M. P. and M. Samso. 2004. Of rings and levers: The dynein motor comes of age. *Trends Cell Biol.* 14: 612–619. [R]

Lasek, R. J. and S. T. Brady. 1985. Attachment of transported vesicles to microtubules in axoplasm is facilitated by AMP-PNP. *Nature* 316: 645–647. [P]

Lüders, J. and T. Stearns. 2007. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 161–167. [R]

Moore, A. and L. Wordeman. 2004. The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis. *Trends Cell Biol.* 14: 537–546. [R]

Oiwa, K. and H. Sakakibara. 2005. Recent progress in dynein structure and mechanism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 98–103. [R]

Pedersen, L. B., I. R.Veland, J. M. Schroder and S. T. Christensen. 2008. Assembly of primary cilia. *Dev. Dyn.* 237: 1993–2006. [R]

Roegiers, F. 2003. Insights into mRNA transport in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1465–1466. [R]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5: 154–157. [R]

Scholey, J. M. 2008. Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J. Cell Biol.* 180: 23–29. [R]

Scholey, J. M., I. Brust-Mascher and A. Mogilner. 2003. Cell division. *Nature* 422: 746–752. [R]

Vale, R. D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467–480. [R]

Vale, R. D., T. S. Reese and M. P. Sheetz. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42: 39–50. [P]

Vaughan, K. T. 2004. Surfing, regulating and capturing: Are all microtubule-tip-tracking proteins created equal? *Trends Cell Biol.* 14: 491–496. [R]

Yildiz, A. and P. R. Selvin. 2005. Kinesin: Walking, crawling or sliding along? *Trends Cell Biol.* 15: 112–120. [R]

CAPÍTULO 13

Membrana plasmática

TODAS LAS CÉLULAS —TANTO PROCARIOTAS COMO EUCARIOTAS— están rodeadas por la membrana plasmática, que define el límite de la célula y separa su contenido interno del medio externo. Debido a que actúa como una barrera selectiva al paso de las moléculas, la membrana plasmática determina la composición del citoplasma. En último término esto define la identidad de la célula, por lo que la membrana plasmática es una de las estructuras más importantes de la evolución celular. De hecho, como se estudió en el Capítulo 1, se cree que la primera célula surgió al quedar rodeado un ARN autorreplicante por una membrana de fosfolípidos.

La estructura básica de la membrana plasmática de las células modernas es la bicapa lipídica, que es impermeable a la mayoría de las moléculas hidrosolubles. Por tanto, el paso de iones y de la mayor parte de las moléculas biológicas a través de la membrana plasmática es mediado por proteínas, que son las responsables del tráfico selectivo de las moléculas tanto al interior como al exterior celular. Otras proteínas de la membrana plasmática controlan las interacciones entre las células de los organismos multicelulares y actúan como sensores a través de los cuales la célula recibe señales del medio. Por tanto, la membrana plasmática desempeña un papel doble: aísla al citoplasma e igualmente media las interacciones entre la célula y su medio.

Estructura de la membrana plasmática

Como todas las demás membranas celulares, la membrana plasmática está constituida por lípidos y proteínas. La estructura fundamental de la membrana es la bicapa lipídica, que forma una barrera estable entre dos compartimentos acuosos. En el caso de la membrana plasmática estos compartimentos son el interior y el exterior celular. Las proteínas embebidas dentro de la bicapa lipídica llevan a cabo las funciones específicas de la membrana plasmática, incluyendo el transporte selectivo de moléculas y el reconocimiento intercelular.

Bicapa lipídica

La membrana plasmática es la membrana que se ha estudiado más a fondo de todas las membranas celulares, y la concepción actual que tenemos de la estructura de las membranas se debe, en gran medida, a las investigaciones sobre la membrana plasmática. Las membranas plasmáticas de los glóbulos

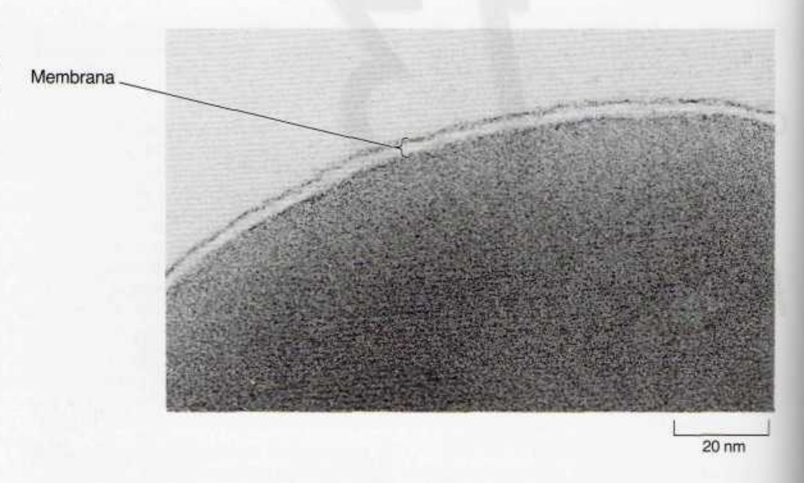


Figura 13.1 Estructura en bicapa de la membrana plasmática. Micrografía electrónica de un glóbulo rojo humano. Obsérvese la apariencia de «vía de tren» de la membrana plasmática. (Cortesía de J. David Robertson, Duke University Medical Center.)

rojos sanguíneos de los mamíferos (eritrocitos) han sido particularmente útiles como modelo para el estudio de la estructura de las membranas. Los glóbulos rojos de los mamíferos no contienen núcleo ni membranas internas, por lo que representan una fuente a partir de la cual aislar fácilmente las membranas plasmáticas puras para su análisis bioquímico. De hecho, los estudios sobre la membrana plasmática de los glóbulos rojos proporcionaron la primera evidencia de que las membranas biológicas estaban constituidas por una bicapa lipídica. En 1925, dos científicos holandeses (E. Gorter y R. Grendel) extrajeron los lípidos de membrana de un número conocido de glóbulos rojos, que se correspondían a una superficie conocida de membrana plasmática. Entonces determinaron la superficie ocupada por una única capa de los lípidos extraídos, al extenderlos sobre una interfase aire-agua. La superficie ocupada por la monocapa lipídica resultó ser el doble de la ocupada por las membranas plasmáticas eritrocíticas, lo que llevó a la conclusión de que las membranas estaban constituidas por bicapas lipídicas en lugar de por monocapas.

La estructura en bicapa de la membrana plasmática de los eritrocitos se pone de manifiesto claramente mediante micrografías electrónicas de elevado aumento (Fig. 13.1). La membrana plasmática aparece como dos líneas densas separadas por un espacio intermedio —una morfología referida frecuentemente como apariencia de «vía de ferrocarril»—. Esta imagen se obtiene debido a la unión de los metales pesados electrodensos, empleados como tinción en la microscopia electrónica de transmisión (véase Cap. 1), sobre las cabezas polares de los fosfolípidos que de esta manera aparecen como líneas oscuras. Estas líneas densas están separadas por la porción interna de la membrana, teñida muy ligeramente, que contiene las cadenas de ácidos grasos hidrofóbicas.

Como se describió en el Capítulo 2, las membranas plasmáticas de las células animales contienen cuatro fosfolípidos principales (**fosfatidilcolina**, **fosfatidiletanolamina**, **fosfatidilserina**, y **esfingomielina**), que juntos constituyen más de la mitad de los lípidos en la mayoría de las membranas. Estos fosfolípidos se distribuyen de manera asimétrica entre las dos mitades de la bicapa de la membrana (Fig. 13.2). La capa externa de la membrana plasmática está compuesta principalmente por fosfatidilcolina y esfingomielina, mientras que la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina son los fosfolípidos predominantes de la capa interna. Las cabezas, tanto la fosfatidilserina como el fosfatidilinositol, están cargadas negativamente, de forma que su predominancia en las caras internas resulta en una carga neta nega-

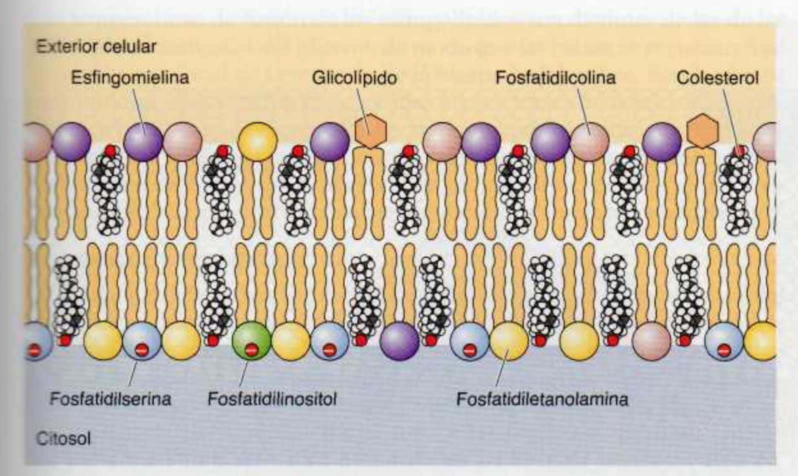


Figura 13.2 Componentes lipídicos de la membrana plasmática. La capa externa está constituida predominantemente por fosfatidilcolina, esfingomielina y glicolípidos, mientras que la capa interna contiene fosfatidil etanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. El colesterol se distribuye en ambas capas. Se indica la carga neta negativa de las cabezas de fosfatidilserina y fosfatidilinositol. Las estructuras de fosfolípidos, glicolípidos y colesterol se muestran en las Figuras 2.7, 2.8 y 2.9, respectivamente.

tiva en la cara citosólica de la membrana plasmática. Un quinto fosfolípido, el **fosfatidilinositol**, se encuentra también localizado en la capa interna de la membrana plasmática. Aunque el fosfatidilinositol es un componente cuantitativamente minoritario, desempeña funciones relevantes en la endocitosis (como se aborda en una sección posterior de este capítulo), en las uniones celulares (descrito en el Cap. 14) y en la señalización celular (recogido en el Cap. 15).

Además de los fosfolípidos, las membranas plasmáticas de las células animales contienen **glicolípidos** y **colesterol**. Los glicolípidos se encuentran exclusivamente en la capa externa de la membrana plasmática, con sus residuos hidrocarbonados expuestos a la superficie celular. Son componentes relativamente minoritarios, constituyendo sólo cerca del 2% de los lípidos de la mayoría de las membranas plasmáticas. El colesterol, por el contrario, es un componente mayoritario de las membranas de las células animales, estando presente en casi las mismas cantidades molares que los fosfolípidos.

Dos características generales de las bicapas fosfolipídicas resultan críticas para la función de la membrana. Primero, la estructura de los fosfolípidos es la responsable de la actuación de las membranas como barreras entre dos compartimentos acuosos. Debido a que el interior de la bicapa fosfolipídica está ocupado por cadenas de ácidos grasos hidrofóbicas, la membrana es impermeable a moléculas hidrosolubles, incluyendo iones y la mayoría de las moléculas biológicas. Segundo, las bicapas de los fosfolípidos que se encuentran en la naturaleza son fluidos viscosos, no sólidos. Los ácidos grasos de la mayor parte de los fosfolípidos naturales tienen uno o más enlaces dobles, que introducen codos en las cadenas hidrocarbonadas y dificultan su empaquetamiento. Por tanto, las largas cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos se mueven libremente en el interior de la membrana, por lo que la membrana es ligera y flexible. Además, tanto los fosfolípidos como las proteínas son libres de difundir lateralmente dentro de la membrana —una propiedad fundamental para muchas de las funciones de la membrana.

Debido a su estructura en anillo rígido, el colesterol desempeña un papel característico en la estructura de la membrana. El colesterol no formará una membrana por sí mismo, pero se inserta dentro de la bicapa de fosfolípidos con sus grupos polares hidróxilo próximos a las cabezas de los fosfolípidos (véase Fig. 13.2). Dependiendo de la temperatura, el colesterol tiene efectos diferentes sobre la fluidez de la membrana. A temperaturas altas el colesterol interfiere con el movimiento de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, lo que disminuye la fluidez de la parte externa de la membrana y

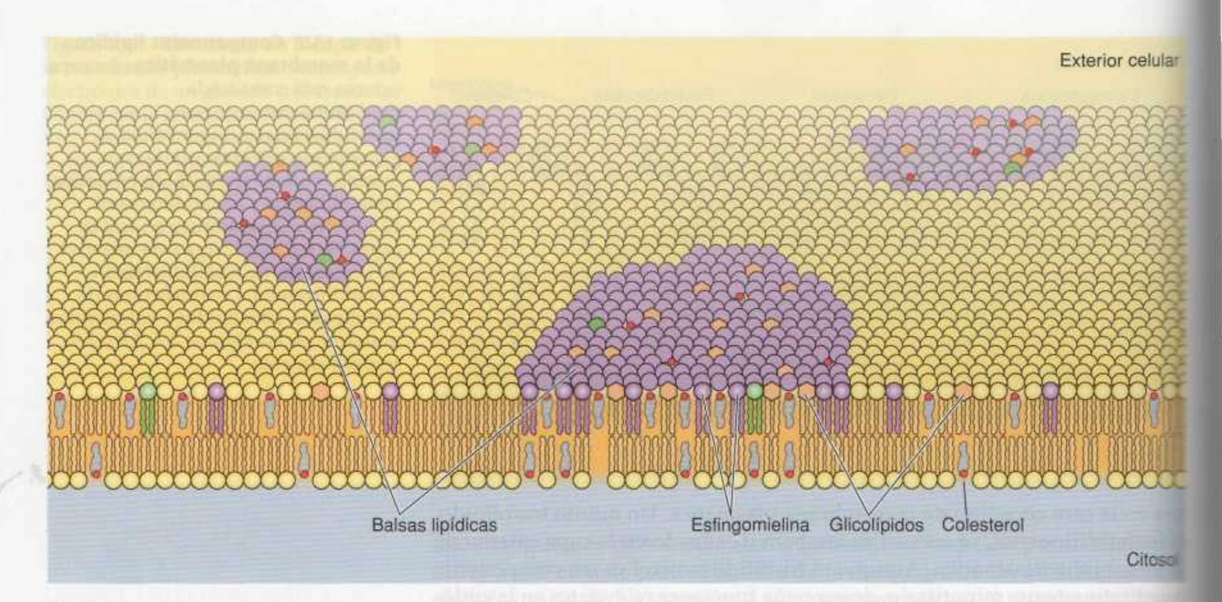


Figura 13.3 Estructura de las balsas lipídicas. Las balsas lipídicas se forman como consecuencia de las interacciones entre esfingomielina, glicolípidos y colesterol.

reduce su permeabilidad a las moléculas pequeñas. A bajas temperaturas, sin embargo, el colesterol tiene el efecto opuesto: al interferir con las interacciones entre las cadenas de los ácidos grasos el colesterol protege a las membranas de congelarse y mantiene la fluidez de la membrana. El colesterol constituye un componente clave de las membranas plasmáticas de las células animales. Las células bacterianas y vegetales carecen de colesterol, sino otros compuestos relacionados (esteroles o lípidos similares a éstos) que desempeñan una función semejante.

En lugar de difundir libremente en la membrana plasmática, el colesterol y los esfingolípidos (esfingomielina y glicolípidos) tienden a agregarse en pequeñas placas semisólidas conocidas como **balsas lipídicas** (Fig. 13.3).

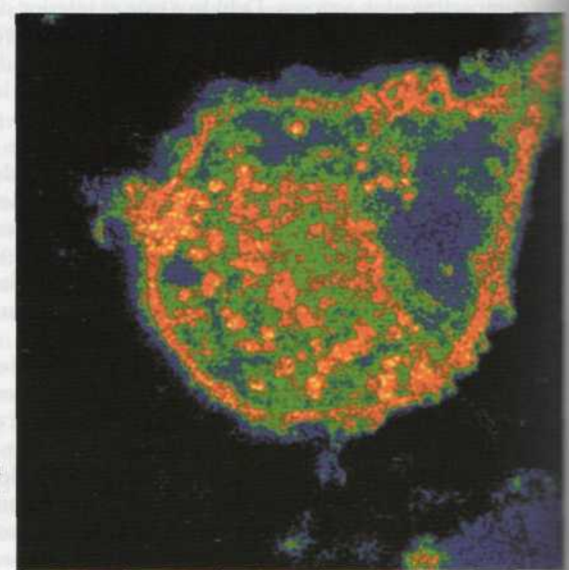


Figura 13.4 Visualización de las balsas lipídicas en la membrana plasmática. La tinción de la membrana plasmática de un macrófago con el colorante fluorescente Laurdan permite visualizar en ella los dominios lipídicos muy ordenados (balsas lipídicas). (Adaptado de K. Gaus, y cols., 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:15555.)

Las temperaturas de fusión de los esfingolípidos son distintas de las de los fosfolípidos derivados del glicerol, de modo que las balsas se encuentran en un nivel superior al de la mayoría de la bicapa fosfolipídica. Este hecho ha permitido su visualización en las células vivas a través de la microscopia bifotónica (véase Fig. 1.32) con una sonda fluorescente sensible a la rigidez de la bicapa fosfolipídica (Fig. 13.4). Como se comentará más adelante en este capítulo, en las balsas lipídicas abundan las proteínas ancladas a GPI y algunas proteínas que participan en la señalización celular y la endocitosis.

Proteínas de membrana

Mientras los lípidos son los elementos estructurales fundamentales de las membranas, las proteínas son las responsables de realizar las funciones específicas de la misma. La mayor parte de las membranas plasmáticas están compuestas por, aproximadamente, un 50% de lípidos y un 50% de proteínas en peso, constituyendo las fracciones hidrocarbonadas de los glicolípidos y glicoproteínas de un 5% a un 10% de la masa de la membrana. Como las proteínas son mucho más grandes que los lípidos, este porcentaje corresponde a casi una molécula de proteína por cada 50 o 100 moléculas de lípidos. En 1972, Jonathan Singer y Garth Nicolson propusieron el **modelo de mosaico fluido** de la estructura de la membrana, que actualmente está aceptado como el paradigma fundamental de la organización de todas las membranas biológicas. En este modelo, las membranas se consideran fluidos bidimensionales en los que las proteínas se insertan dentro de bicapas lipídicas (Fig. 13.5).

Singer y Nicolson distinguieron dos clases de proteínas asociadas a la membrana, a las que denominaron **proteínas periféricas** e **integrales de membrana**. Las proteínas periféricas de membrana se definieron operativamente como proteínas que se disociaban de la membrana tras el tratamiento con agentes polares, como soluciones de pH extremo o de alta concentración salina, que no rompen la bicapa fosfolipídica. Una vez disociadas de la membrana, las proteínas periféricas de membrana son solubles en tampones acuosos. Estas proteínas no se insertan en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica. En vez de esto, se asocian indirectamente con las membra-

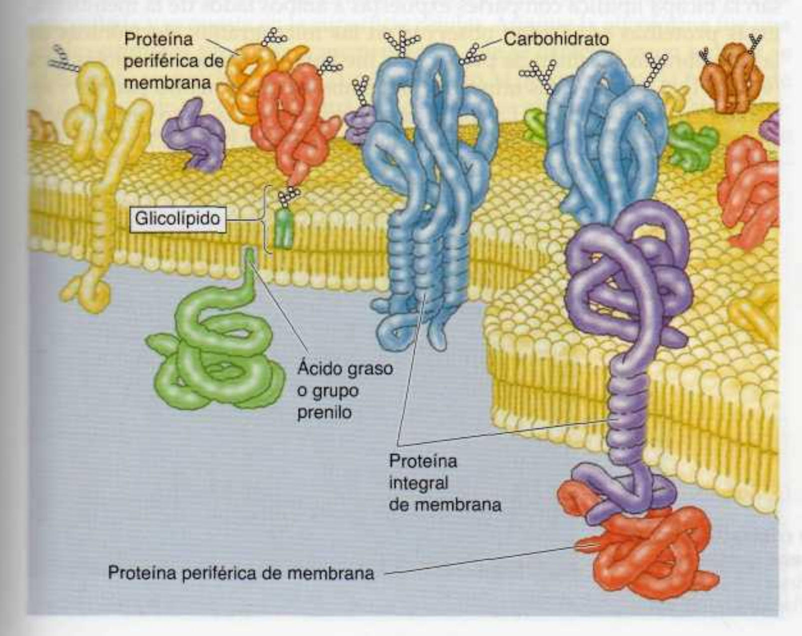


Figura 13.5 Modelo del mosaico fluido de la membrana plasmática. Las proteínas integrales de membrana se insertan dentro de la bicapa lipídica, mientras que las proteínas periféricas se fijan a la membrana indirectamente mediante interacciones proteína-proteína. La mayoría de las proteínas integrales de membrana es proteína transmembrana, con porciones expuestas a ambos lados de la bicapa lipídica. La parte extracelular de estas proteínas aparece generalmente glicosilada, al igual que las proteínas periféricas de membrana unidas a la cara externa de la misma.

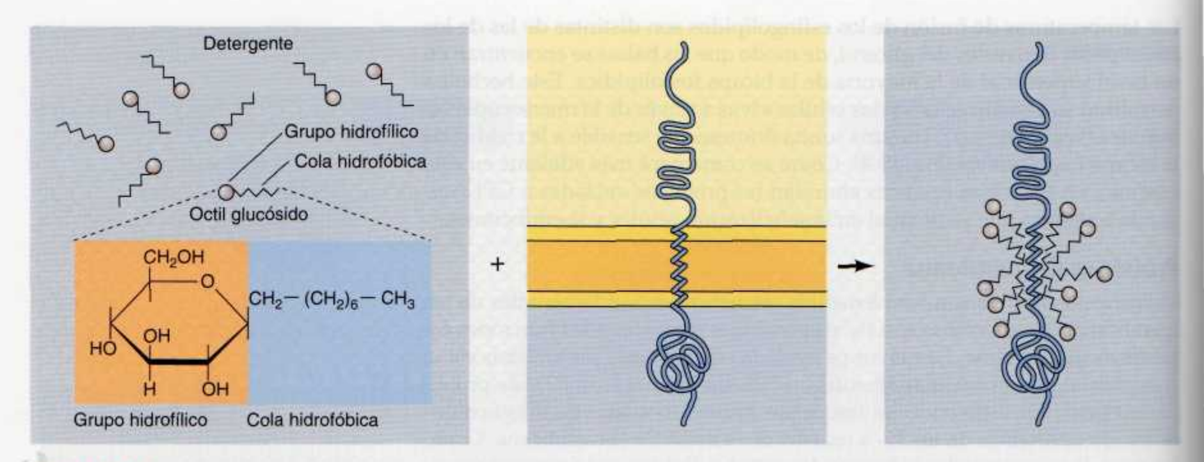


Figura 13.6 Solubilización de las proteínas integrales de membrana mediante detergentes. Los detergentes (p. ej., octil glucósido) son moléculas anfipáticas que contienen cabezas hidrofílicas y colas hidrofóbicas. Las colas hidrofóbicas se unen a las regiones hidrofóbicas de las proteínas integrales de membrana, formando un complejo detergente-proteína que es soluble en solución acuosa.

nas a través de interacciones proteína-proteína. Estas interacciones frecuentemente implican enlaces iónicos, que se ven afectados por el pH extremo o la alta salinidad.

A diferencia de las proteínas periféricas de membrana, las proteínas integrales de membrana solamente pueden ser liberadas mediante tratamientos que rompan la bicapa fosfolipídica. Estas proteínas integrales de membrana tienen partes que se insertan dentro de la bicapa lipídica, por lo que sólo pueden ser disociadas mediante agentes que alteren las interacciones hidrofóbicas. Los agentes más comunes utilizados para la solubilización de las proteínas integrales de membrana son los detergentes, que son moléculas pequeñas anfipáticas que contienen tanto grupos hidrofóbicos como hidrofílicos (Fig. 13.6). Las porciones hidrofóbicas de los detergentes desplazan los lípidos de membrana y se unen a las porciones hidrofóbicas de las proteínas integrales de membrana. Debido a que el otro extremo de la molécula de detergente es hidrofílico, los complejos detergente-proteína son solubles en soluciones acuosas.

Muchas proteínas integrales son **proteínas transmembrana**, que atraviesan la bicapa lipídica con partes expuestas a ambos lados de la membrana. Estas proteínas se pueden observar en las micrografías electrónicas de las membranas plasmáticas preparadas mediante la técnica de criofractura (véase Fig. 1.36). En estas muestras, la membrana se encuentra partida y separada en sus dos capas. Las proteínas transmembrana aparecen entonces como partículas sobre la cara interna de la membrana (Fig. 13.7).

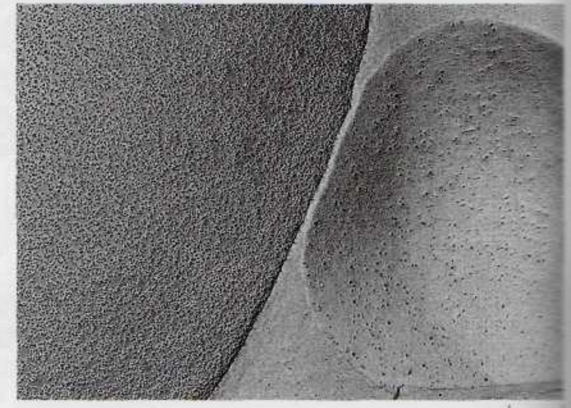


Figura 13.7 Micrografía electrónica de criofractura de membranas de glóbulos rojos sanguíneos humanos. Las partículas en la membrana son proteínas transmembrana. (Harold H. Edwards/ Visuals Unlimited.)

La porción de las proteínas transmembrana que atraviesa la membrana son generalmente α-hélices de 20 a 25 aminoácidos hidrofóbicos que se insertan dentro de la membrana del retículo endoplasmático durante la síntesis de la cadena polipeptídica (véanse Figs. 10.12-10.14). Estas proteínas entonces se transportan en vesículas de membrana desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, y desde allí a la membrana plasmática. A las cadenas polipeptídicas se les añaden grupos carbohidrato, tanto en el retículo endoplasmático como en el aparato de Golgi, por lo que la mayoría de las proteínas transmembrana de la membrana plasmática son glicoproteínas con sus oligosacáridos expuestos en la superficie de la célula.

Los estudios en glóbulos rojos han proporcionado buenos ejemplos de proteínas periféricas e integrales asociadas con la membrana plasmática. Las membranas de los eritrocitos humanos contienen cerca de una docena de proteínas principales, que se identificaron originalmente mediante electroforesis en gel de preparaciones de membrana. La mayor parte de éstas son proteínas periféricas de membrana que se han identificado como componentes del citoesqueleto cortical, que subyace a la membrana plasmática y determina la forma celular (véase Cap. 12). Por ejemplo, la proteína periférica de membrana más abundante de los glóbulos rojos es la espectrina, que es la principal proteína del citoesqueleto de los eritrocitos (véase Fig. 12.14). Otras proteínas periféricas de membrana de los glóbulos rojos son la actina, la anquirina y la banda 4.1. La anquirina es el principal puente de unión entre la membrana plasmática y el citoesqueleto, uniéndose a la espectrina y a la proteína integral de membrana banda 3. Un nexo adicional entre la membrana y el citoesqueleto lo proporciona la banda 4.1, que se fija a las uniones de espectrina y actina, así como a la glicoforina (la otra proteína integral de membrana importante de los eritrocitos).

Las dos proteínas integrales de membrana principales de los glóbulos rojos, glicoforina y banda 3, proporcionan ejemplos bien estudiados de la estructura de las proteínas transmembrana (Fig. 13.8). La glicoforina es una glicoproteína pequeña de 131 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 30.000, del cual la mitad corresponde a la fracción de proteínas y la otra mitad a carbohidrato. La glicoforina atraviesa la membrana mediante una única α-hélice de 23 aminoácidos y la porción aminoterminal está glicosilada y expuesta en la superficie celular. Aunque la glicoforina fue una de las primeras proteínas transmembrana que se caracterizaron todavía se desconoce su función exacta. Por el contrario, sí que se conoce la función de la otra proteína transmembrana principal de los glóbulos rojos. Esta proteína, originariamente conocida como banda 3, es el transportador aniónico responsable del transporte de iones bicarbonato (HCO_3^-) y cloruro (Cl^-) a tra-

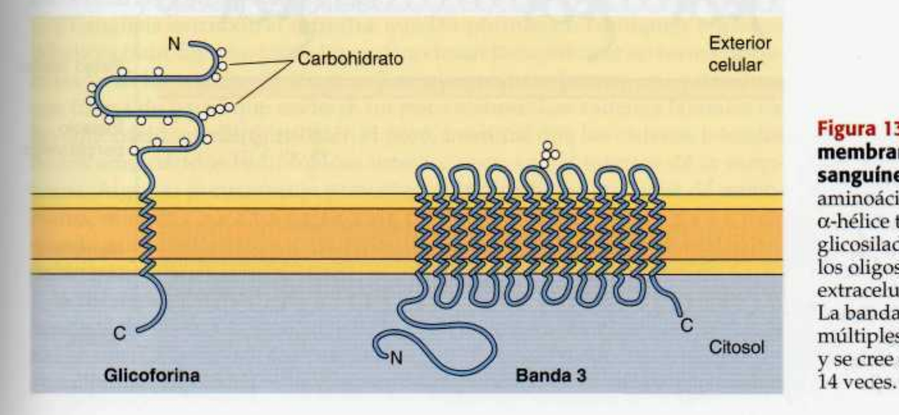


Figura 13.8 Proteínas integrales de membrana de glóbulos rojos sanguíneos. La glicoforina (131 aminoácidos) contiene una única α-hélice transmembrana. Está muy glicosilada, con 16 sitios de unión para los oligosacáridos en la porción extracelular de la cadena polipeptídica. La banda 3 (929 aminoácidos) tiene múltiples α-hélices transmembrana y se cree que atraviesa la membrana 14 veces.

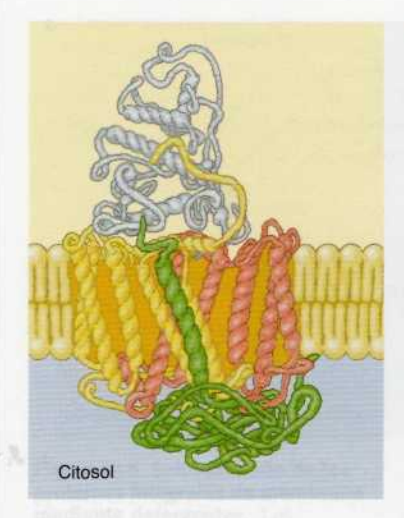


Figura 13.9 Centro de reacción fotosintético de una bacteria. El centro de reacción consta de tres proteínas transmembrana, denominadas L (roja), M (amarilla) y H (verde). Las subunidades L y M cada una tiene cinco α-hélices transmembrana, mientras que la subunidad H solamente tiene una. La cuarta subunidad del centro de reacción es un citocromo (blanco), que es una proteína periférica de membrana.

vés de la membrana del glóbulo rojo. La cadena polipeptídica de la banda 3 consta de 929 aminoácidos y se cree que tiene 14 regiones en α-hélice que atraviesan la membrana. Dentro de la membrana, dímeros de la banda 3 forman estructuras globulares que contienen canales internos a través de los cuales los iones son capaces de cruzar la bicapa lipídica.

Debido a su carácter anfipático es muy difícil conseguir que las proteínas transmembrana cristalicen, como se requiere para un análisis estructural tridimensional por difracción de rayos X. La primera proteína transmembrana en ser analizada por cristalografía de rayos X fue el centro de reacción fotosintético de la bacteria *Rhodopseudomonas viridis*, cuya estructura fue publicada en 1985 (Fig. 13.9). El centro de reacción está constituido por tres proteínas transmembrana, designadas por L, M y H, (del inglés *light*, *medium* y *heavy*, ligera, media y pesada, respectivamente) en función de su tamaño aparente indicado por electroforesis en gel. Las subunidades L y M tienen cada una cinco α-hélices que atraviesan la membrana. La subunidad H tiene únicamente una α-hélice transmembrana y la mayor parte de la cadena polipeptídica se dispone sobre el lado citosólico de la membrana. La cuarta subunidad del centro de reacción es un citocromo, que es una proteína periférica de membrana unida al complejo mediante interacciones proteína-proteína.

Aunque la mayoría de las proteínas transmembrana atraviesan la membrana mediante regiones de α-hélice, esto no siempre es así. Una excepción bien conocida la proporcionan las **porinas** —una clase de proteínas que forman canales en las membranas externas de algunas bacterias—. Muchas bacterias, incluyendo *E. coli*, tienen un sistema doble de membranas en el que la membrana plasmática (o membrana interna) se encuentra rodeada por la pared celular y por una membrana externa diferenciada (Fig. 13.10).

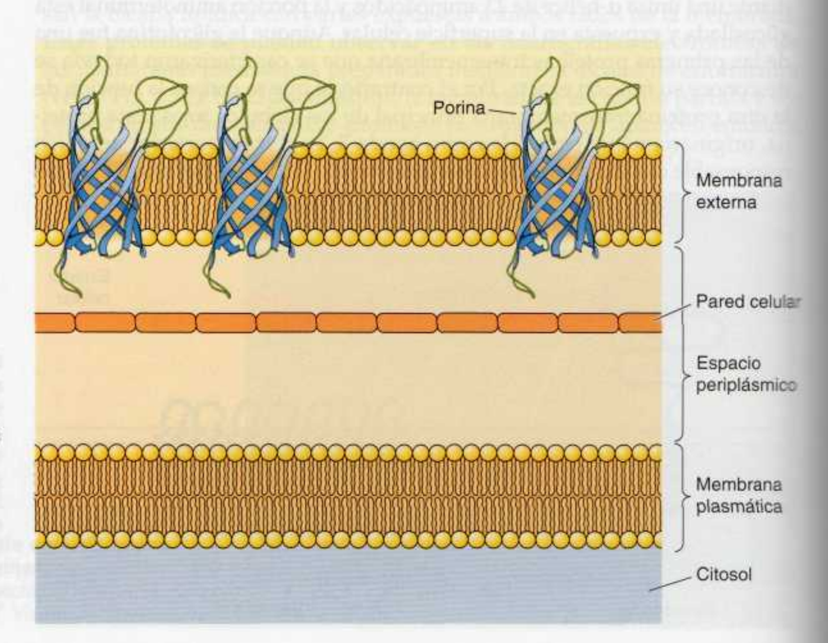


Figura 13.10 Membranas externas bacterianas. La membrana plasmática de algunas bacterias está rodeada por una pared celular con una membrana externa diferenciada. La membrana externa contiene porinas, que forman canales acuosos que permiten la libre circulación de iones y moléculas pequeñas. Las porinas atraviesan la membrana en forma de barriles β.

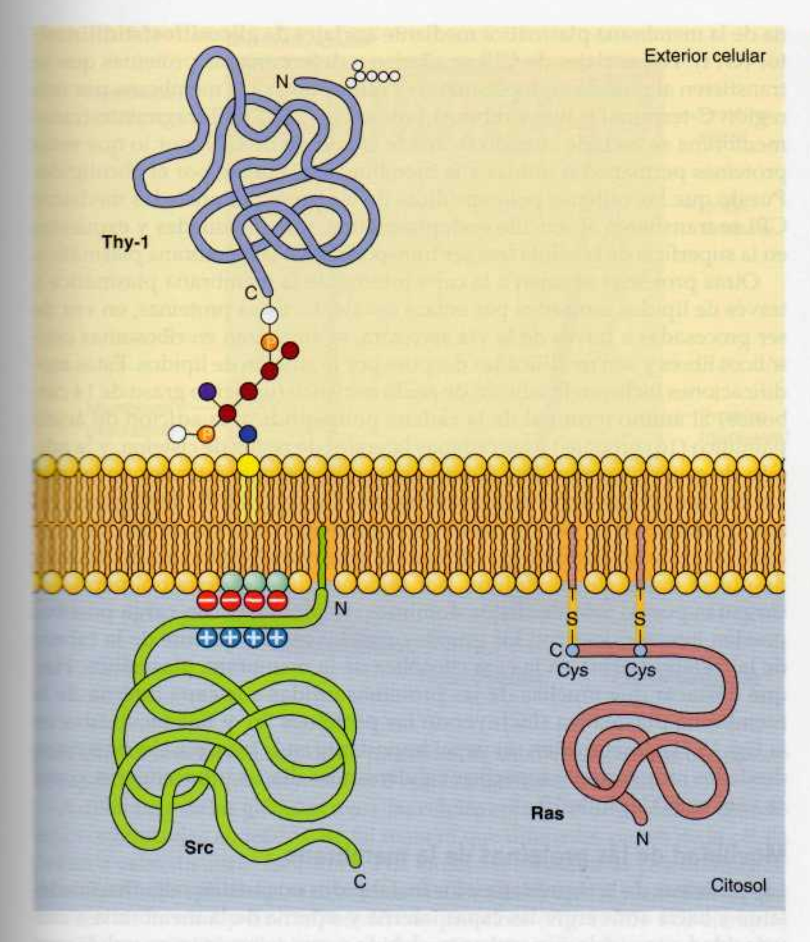


Figura 13.11 Ejemplos de proteínas unidas a la membrana plasmática mediante lípidos y glicolípidos. Algunas proteínas (p. ej., la proteína linfocitaria Thy-1) se unen a la capa externa de la membrana plasmática mediante anclajes de GPI que se añaden a su C-terminal en el retículo endoplásmico. Estas proteínas son glicosiladas y expuestas en la superficie celular. Otras proteínas se unen a la capa interna de la membrana plasmática tras ser traducidas por los ribosomas citosólicos libres. La proteína Ras, que aquí se muestra, se une por un grupo prenilo fijado a la cadena lateral de una cisteína C-terminal y por un grupo palmitoilo unido a una cisteína localizada cinco aminoácidos más adelante. La proteína Src se une a través de un grupo miristoilo unido a su N-terminal. Una región de Src con carga positiva también desempeña un papel en la asociación a la membrana, quizás por interactuar con las cabezas con carga negativa de la fosfatidilserina. Las estructuras de estos grupos lipídicos y glicolipídicos se muestran desde las Figuras 8.33 a 8.36.

A diferencia de la membrana plasmática, la membrana externa es muy permeable a los iones y a las moléculas pequeñas polares (en el caso de *E. coli*, con pesos moleculares de hasta 600). Esta permeabilidad es debida a las porinas, que forman canales acuosos abiertos a través de la bicapa lipídica. Como se describió en el Capítulo 11, también se encuentran proteínas relacionadas con las porinas bacterianas en las membranas externas de las mitocondrias y de los cloroplastos.

El análisis estructural muestra que las porinas no contienen regiones α-hélices hidrofóbicas. En su lugar, atraviesan la membrana en forma de barriles β, en los que 8 a 22 láminas β se pliegan para formar una estructura con forma de barril que encierra un poro acuoso. Las cadenas laterales de los aminoácidos polares revisten el poro, mientras que las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos interaccionan con el interior de la membrana. Algunas porinas están presentes en la membrana en forma de monómeros, mientras que otras se asocian para formar multímeros estables, formando múltiples canales a través de los cuales pueden difundir moléculas polares a través de la membrana.

A diferencia de las proteínas transmembrana, otros tipos de proteínas (muchas de las cuales se comportan como proteínas integrales de membrana) se unen a la membrana plasmática por uniones covalentes a lípidos o a glicolípidos (Fig. 13.11). Una clase de estas proteínas se unen a la capa exter-

na de la membrana plasmática mediante **anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI)**. Los anclajes de GPI se añaden a determinadas proteínas que se transfieren al retículo endoplasmático y que se unen a la membrana por una región C-terminal transmembrana (véase Fig. 10.17). El fragmento transmembrana se escinde cuando se añade el anclaje de GPI, por lo que estas proteínas permanecen unidas a la membrana solamente por el glicolípido. Puesto que las cadenas polipeptídicas de las proteínas ancladas mediante GPI se transfieren al retículo endoplasmático, son glicosiladas y expuestas en la superficie de la célula tras ser transportadas a la membrana plasmática.

Otras proteínas se unen a la capa interna de la membrana plasmática a través de lípidos asociados por enlace covalente. Estas proteínas, en vez de ser procesadas a través de la vía secretora, se sintetizan en ribosomas citosólicos libres y son modificadas después por la adición de lípidos. Estas modificaciones incluyen la adición de ácido mirístico (un ácido graso de 14 carbonos) al amino terminal de la cadena polipeptídica, la adición de ácido palmítico (16 carbonos) a las cadenas laterales de restos de cisteína, y la adición de grupos prenilo (15 o 20 carbonos) a las cadenas laterales de los restos de cisteína carboxilo terminales (véanse Figs. 8.33-8.35). En algunos casos, el destino en la membrana de estas proteínas (muchas de las cuales se comportan como proteínas periféricas de membrana) está marcado, además de por la unión de los lípidos, por regiones de la cadena polipeptídica cargadas positivamente. Estos dominios de proteínas con carga positiva pueden interaccionar con los grupos cargados negativamente de la cabeza de la fosfatidilserina en la cara citosólica de la membrana plasmática. Hay que destacar que muchas de las proteínas unidas a la capa interna de la membrana plasmática (incluyendo las proteínas Src y Ras mostradas en la Fig. 13.11) desempeñan un papel importante en la transmisión de señales desde los receptores de superficie celulares a las dianas intracelulares, como se verá en el Capítulo 15.

Movilidad de las proteínas de la membrana

Las proteínas de la membrana y los fosfolípidos no pueden saltar hacia adelante y hacia atrás entre las capas interna y externa de la membrana a una velocidad apreciable. Sin embargo, debido a que se insertan en una bicapa lipídica fluida, tanto las proteínas como los lípidos son capaces de difundirse lateralmente a través de la membrana. Este movimiento lateral se mostró por primera vez de forma directa en un experimento publicado por Larry Frye y Michael Edidin en 1970, que supuso un apoyo al modelo del mosaico fluido. Frye y Edidin fusionaron células humanas y de ratón en un cultivo para obtener células híbridas ratón-humanas (Fig. 13.12). Analizaron después la distribución de las proteínas en las membranas de estas células híbridas empleando anticuerpos que reconocían específicamente las proteínas de origen humano y de ratón. Estos anticuerpos se marcaron con distintos tintes fluorescentes, por lo que las proteínas humana y de ratón podían distinguirse por microscopia de fluorescencia. Inmediatamente después de la fusión, las proteínas de hombre y de ratón se localizaron en mitades diferentes de las células híbridas. Sin embargo, después de un breve período de incubación a 37 °C, las proteínas de hombre y de ratón se encontraban totalmente mezcladas sobre la superficie celular, lo que indicaba que se movían libremente a través de la membrana plasmática.

Sin embargo, no todas las proteínas son capaces de difundir libremente por la membrana. En algunos casos, la movilidad de las proteínas de membrana se encuentra restringida por su asociación con el citoesqueleto. Por ejemplo, una fracción de la banda 3 en la membrana de los glóbulos rojos está inmovilizada debido a su unión con la anquirina y la espectrina. En otros casos, la movilidad de las proteínas de membrana puede estar restrin-

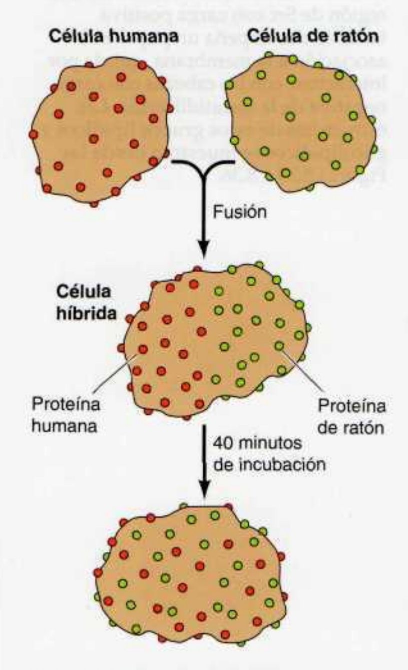


Figura 13.12 Movilidad de las proteínas de la membrana. Se fusionaron células de hombre y de ratón para obtener células híbridas. La distribución de las proteínas en la superficie celular se analizó utilizando anticuerpos anti-humano y anti-ratón marcados con diferentes tintes fluorescentes (rojo y verde, respectivamente). Las proteínas de hombre y de ratón se detectaron en diferentes mitades de las células híbridas inmediatamente después de la fusión, pero tras cuarenta minutos de incubación se habían entremezclado en la superficie celular.

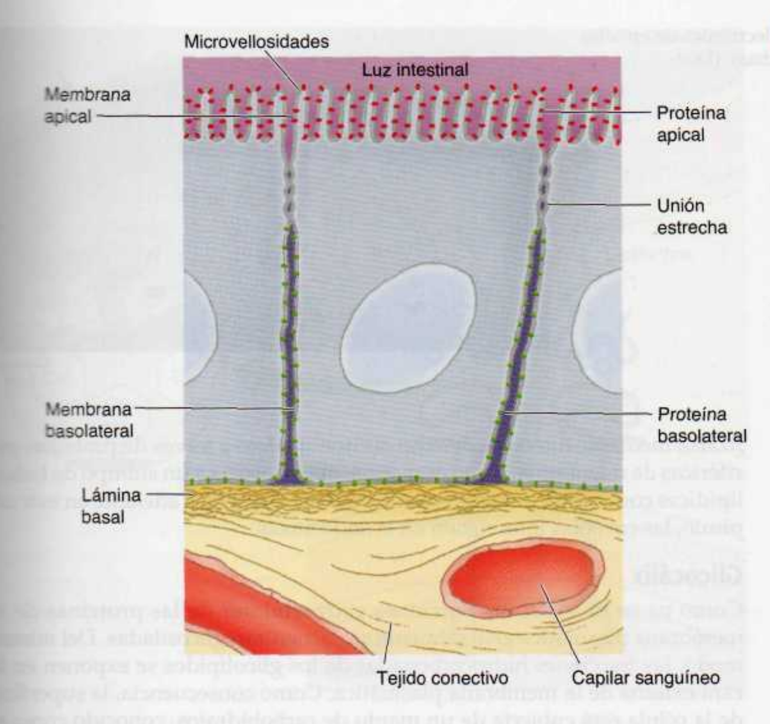


Figura 13.13 Célula epitelial intestinal polarizada. La superficie apical de la célula contiene microvellosidades y está especializada en la absorción de nutrientes desde la luz intestinal. La superficie basolateral está especializada en la transferencia de los nutrientes absorbidos al tejido conectivo subyacente, que contiene capilares sanguíneos. Las uniones estrechas separan los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática. Las proteínas de membrana se difunden libremente dentro de cada dominio, pero no son capaces de cruzar de un dominio al otro.

gida por su asociación con otras proteínas de membrana, con proteínas de la superficie de células adyacentes o con la matriz extracelular.

A diferencia de los glóbulos rojos, las células epiteliales se polarizan cuando están organizadas en tejidos, de tal manera que diferentes partes de la célula llevan a cabo distintas funciones. Por tanto, las membranas plasmáticas de muchas células epiteliales se dividen en los **dominios apical** y **basolateral** que difieren en función y en composición de proteínas (Fig. 13.13). Por ejemplo, las células epiteliales del intestino delgado actúan absorbiendo nutrientes desde el tracto digestivo. La superficie apical de estas células, que encara la luz intestinal, está cubierta por microvellosidades, que incrementa su área de superficie y facilita la absorción de nutrientes. La superficie basolateral, que encara al tejido conectivo subyacente y al aporte sanguíneo, está especializada en la transferencia hacia la circulación de los nutrientes absorbidos. Para mantener estas funciones diferenciadas, la movilidad de las proteínas de la membrana plasmática debe estar restringida a los dominios pertinentes de la superficie celular. Uno de los mecanismos por el que esto tiene lugar implica la formación de uniones estrechas (que se tratan en el Cap. 14) entre las células adyacentes del epitelio. Estas uniones no sólo sellan el espacio entre las células sino que también sirven como barreras para el movimiento de los lípidos y proteínas de membrana. Como resultado, las proteínas son capaces de difundir tanto dentro del dominio apical como del basolateral de la membrana plasmática pero no son capaces de cruzar de un dominio a otro.

La composición lipídica también puede influir en la difusión libre de las proteínas de membrana. Como se ha reseñado anteriormente, las proteínas ancladas a GPI se agrupan en balsas lipídicas, en las que abundan la esfingomielina, los glicolípidos y el colesterol (véase Fig. 13.3). Por otra parte, varios tipos de proteínas de membrana entran y salen de las balsas, lo que facilita la agrupación de estas proteínas para procesos como el movimiento o la señalización celular. De igual modo, las balsas lipídicas pueden estabi-

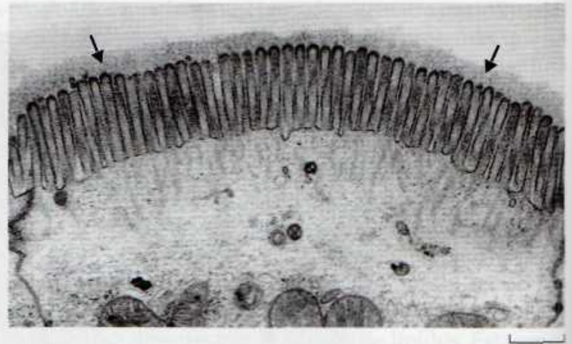


Figura 13.14 Glicocálix. Micrografía electrónica de epitelio intestinal mostrándose el glicocálix (flechas). (Don Fawcett/Visuals Unlimited.)

lizarse mediante interacciones con el citoesqueleto a través de proteínas periféricas de membrana, como caveolina, que se asocia a un subtipo de balsas lipídicas conocidas como caveolas. Como se tratará más adelante en este capítulo, las caveolas intervienen en la endocitosis.

Glicocálix

Como ya se ha visto, las porciones extracelulares de las proteínas de la membrana plasmática generalmente se encuentran glicosiladas. Del mismo modo, las fracciones hidrocarbonadas de los glicolípidos se exponen en la cara externa de la membrana plasmática. Como consecuencia, la superficie de la célula está cubierta de un manto de carbohidratos, conocido como el **glicocálix**, constituido por los oligosacáridos de los glicolípidos y de las glicoproteínas transmembrana (Fig. 13.14).

El glicocálix protege a la superficie celular frente al estrés iónico y mecánico, además de crear una barrera frente a microorganismos invasores. Además, los oligosacáridos del glicocálix participan como marcadores de varios tipos de interacciones célula-célula. Un ejemplo bien estudiado de una interacción fisiológica en la que interviene el glicocálix de los glóbulos blancos sanguíneos (leucocitos) a las células endoteliales que limitan los vasos sanguíneos —proceso que permite a los leucocitos abandonar el sistema circulatorio e intervenir en la respuesta inflamatoria en los tejidos dañados—. El primer paso en la adhesión entre los leucocitos y las células endoteliales está mediado por una familia de proteínas transmembrana denominadas **selectinas**, que reconocen carbohidratos específicos de la superficie celular (Fig. 13.15). Dos miembros de la familia de las selectinas (E-selectina y P-selectina), que se expresan en las células endoteliales y en las plaquetas, se unen a oligosacáridos específicos expresados en la superficie de los leucocitos. Una selectina diferente (L-selectina) se expresa en los leucocitos y reconoce un oligosacárido en la superficie de las células endoteliales. Por tanto, los oligosacáridos expuestos en la superficie celular proporcionan un conjunto de marcadores que ayudan a identificar los distintos tipos de células de los organismos pluricelulares.

Transporte de moléculas pequeñas

La célula mantiene su composición interna debido a que la membrana plasmática es selectivamente permeable a las moléculas pequeñas. La mayoría de las moléculas biológicas es incapaz de difundir a través de la bicapa fosfolipídica, por lo que la membrana plasmática constituye una barrera que impide el libre intercambio de moléculas entre el citoplasma y el medio externo de la célula. Son las proteínas de transporte específicas (proteínas

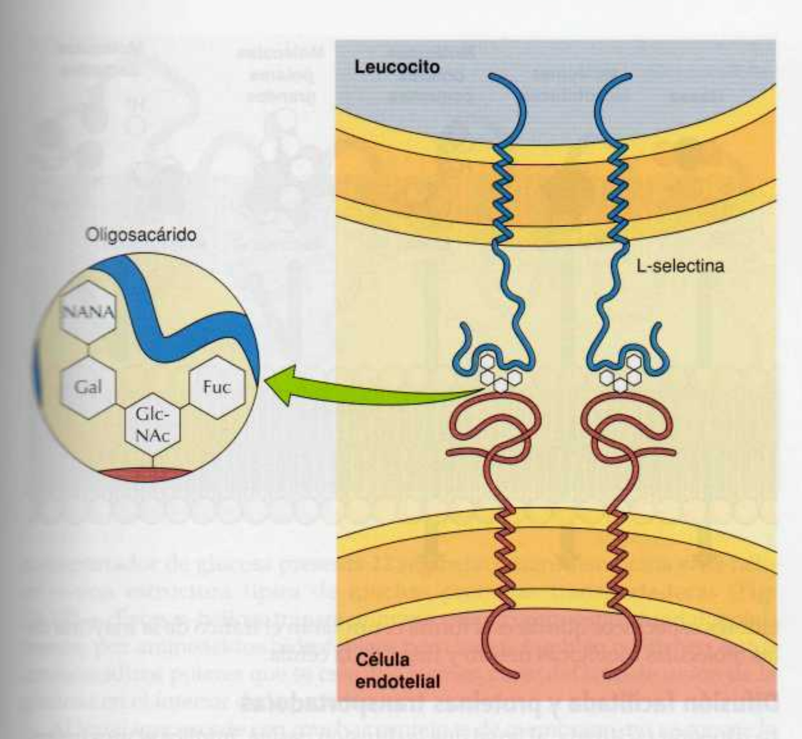


Figura 13.15 Unión de las selectinas a los oligosacáridos. La E-selectina es una proteína transmembrana que se expresa en los leucocitos que se une a un oligosacárido de la superficie de las células endoteliales. El oligosacárido reconocido por la L-selectina contiene *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc), galactosa (Gal) y ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico, NANA).

transportadoras *carriers* y las proteínas de canal) las responsables del tránsito selectivo de las moléculas pequeñas a través de la membrana, permitiendo a la célula controlar la composición de su citoplasma.

Difusión pasiva

El mecanismo más sencillo mediante el que las moléculas pueden atravesar la membrana plasmática es la **difusión pasiva**. En la difusión pasiva una molécula se disuelve en la bicapa fosfolipídica, difunde a través de ella, y después se disuelve en la solución acuosa al otro lado de la membrana. No interviene ninguna proteína de membrana y la dirección del transporte viene determinada simplemente por las concentraciones relativas de la molécula dentro y fuera de la célula. El flujo neto de las moléculas se produce a favor de su gradiente de concentración —desde un compartimento con una concentración elevada de la molécula a otro con una concentración inferior.

Por tanto, la difusión pasiva es un proceso no selectivo por el que cualquier molécula capaz de disolverse en la bicapa fosfolipídica es capaz de atravesar la membrana plasmática y alcanzar el equilibrio entre el interior y el exterior celular. Es importante señalar que sólo las moléculas pequeñas y relativamente hidrofóbicas son capaces de difundir a través de la bicapa fosfolipídica a una velocidad significativa (Fig. 13.16). De esta manera, los gases (como el O_2 y el CO_2), las moléculas hidrofóbicas (como el benceno), y las moléculas pequeñas polares pero sin carga (como el H_2O y el etanol) son capaces de difundir a través de la membrana plasmática. Sin embargo, otras moléculas biológicas son incapaces de disolverse en el interior hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica. Debido a esto, las moléculas polares grandes no cargadas, como la glucosa, son incapaces de atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva, al igual que tampoco lo pueden hacer las moléculas cargadas, independientemente del tamaño (incluyendo iones pequeños como H^+, Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^-). El transporte de estas moléculas a través de la membrana requiere la participación de proteínas de canal y transpor-

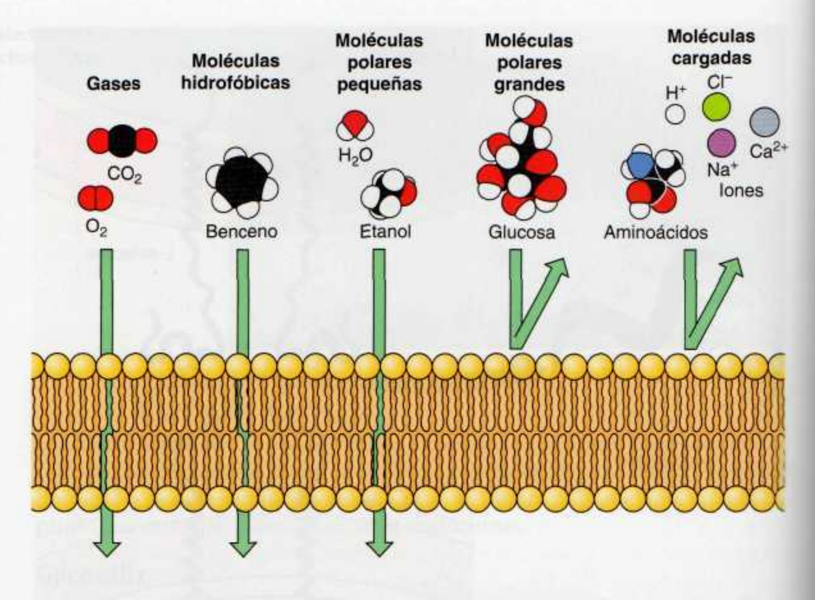


Figura 13.16 Permeabilidad de las bicapas fosfolipídicas. Los gases, las moléculas hidrofóbicas y las pequeñas moléculas polares sin carga pueden difundir a través de las bicapas fosfolipídicas. No pueden hacerlo las moléculas polares más grandes ni las moléculas cargadas.

tadores específicos que de esta forma controlarán el tráfico de la mayoría de las moléculas biológicas dentro y fuera de la célula.

Difusión facilitada y proteínas transportadoras

La **difusión facilitada**, al igual que la difusión pasiva, implica el movimiento de las moléculas en la dirección determinada por sus concentraciones relativas dentro y fuera de la célula. No interviene ninguna fuente de energía externa, por lo que las moléculas se desplazan a través de la membrana en la dirección determinada por sus gradientes de concentración y, en el caso de las moléculas cargadas, por el potencial eléctrico a través de la membrana. Sin embargo, la difusión facilitada se diferencia de la difusión pasiva en que las moléculas transportadas no se disuelven en la bicapa fosfolipídica. En su lugar, su tránsito viene mediado por proteínas que permiten a las moléculas transportadas atravesar la membrana sin interaccionar directamente con su interior hidrofóbico. Por tanto, la difusión facilitada permite a las moléculas cargadas y a las polares, como carbohidratos, aminoácidos, nucleósidos e iones, atravesar la membrana plasmática.

Se suelen distinguir dos clases de proteínas que intervienen en la difusión facilitada: proteínas transportadoras y proteínas de canal. Las **proteínas transportadoras** se unen, en un lado de la membrana, a las moléculas específicas que han de ser transportadas. Después sufren un cambio conformacional que permite que la molécula pase a través de la membrana y sea liberada al otro lado. En cambio, las **proteínas de canal** forman poros abiertos a través de la membrana y permiten la libre difusión de cualquier molécula del tamaño y carga apropiados.

Las proteínas transportadoras son las responsables de la difusión facilitada de los azúcares, aminoácidos y nucleósidos a través de la membrana plasmática de la mayoría de las células. La entrada de la glucosa, que es la fuente principal de energía metabólica, es una de las funciones de transporte más importantes de la membrana plasmática, y el transportador de glucosa proporciona un ejemplo bien estudiado de una proteína transportadora. El transportador de glucosa se identificó inicialmente como una proteína de 55-kDa en los glóbulos rojos sanguíneos humanos, donde representa aproximadamente el 5% de la proteína total de la membrana. El aislamiento y el análisis posterior de la secuencia de un clon de ADNc revelaron que el

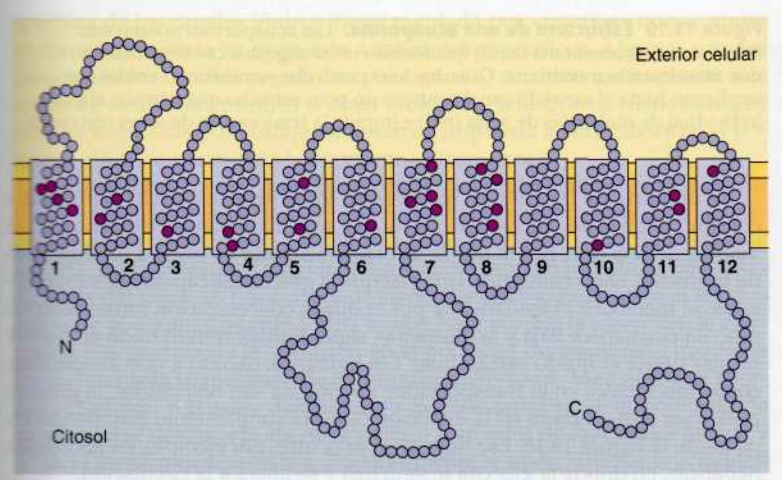


Figura 13.17 Estructura del transportador de la glucosa. El transportador de la glucosa tiene 12 α-hélices transmembrana. Los restos aminoacídicos polares situados dentro de la bicapa fosfolipídica vienen indicados como círculos morado oscuro. (Adaptado de G. I. Bell, C. F. Burant, J. Takeda y G. W. Gould, 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 19161.)

transportador de glucosa presenta 12 segmentos transmembrana en α-hélice —una estructura típica de muchas proteínas transportadoras (Fig. 13.17)—. Estas α-hélices transmembrana están compuestas, fundamentalmente, por aminoácidos hidrofóbicos pero varias también contienen restos aminoacídicos polares que se cree que forman parte del sitio de unión de la glucosa en el interior de la proteína.

Al igual que sucede con muchas proteínas de membrana, no se conoce la estructura tridimensional del transportador de la glucosa, por lo que el mecanismo molecular del transporte de la glucosa es una incógnita. Sin embargo, los estudios cinéticos indican que el transportador de la glucosa funciona alternando entre dos conformaciones (Fig. 13.18). En la primera conformación, el sitio de unión a la glucosa se sitúa frente al exterior de la célula. La unión de la glucosa a este sitio induce un cambio conformacional en el transportador, de tal manera que el sitio de unión de la glucosa ahora se sitúa frente al interior celular. Entonces la glucosa puede ser liberada en el citosol y el transportador recupera su conformación inicial.

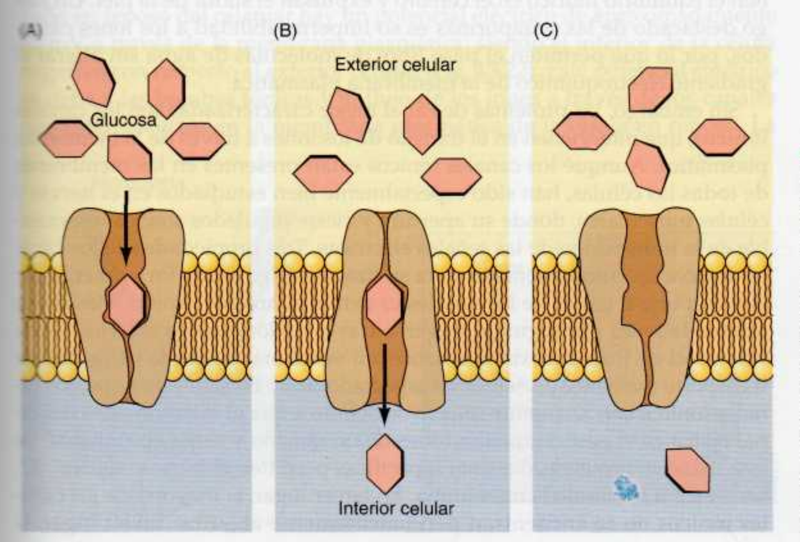


Figura 13.18 Modelo para la difusión facilitada de la glucosa. El transportador de la glucosa alterna entre dos conformaciones en donde el sitio de unión de la glucosa se encuentra alternativamente expuesto al exterior y al interior celular. En la primera conformación mostrada (A), la glucosa se fija al sitio expuesto al exterior de la membrana plasmática. El transportador entonces sufre un cambio conformacional, de manera que el sitio de unión de la glucosa encara al interior de la célula y la glucosa se libera al citosol (B). Entonces, el transportador recupera su conformación original (C).

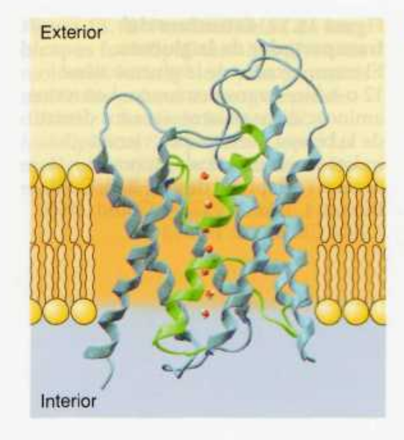


Figura 13.19 Estructura de una acuaporina. Las acuaporinas poseen seis α-hélices transmembrana (azul) que forman unos angostos canales acuosos que atraviesan la membrana. Oras dos asas crean dos semihélices (verde) que se pliegan hacia el canal. El canal contiene un poro estrecho que permite el paso individual de moléculas de agua (red) e impide la traslocación de iones con carga.

La mayoría de las células, incluyendo los eritrocitos, están expuestas a concentraciones de glucosa extracelulares más altas que las existentes en el interior de la célula, por lo que la difusión facilitada da lugar a un flujo neto de la glucosa hacia el interior. Una vez que la glucosa es captada por estas células, se metaboliza rápidamente por lo que la concentración intracelular de glucosa permanece baja y la glucosa se sigue transportando hacia el interior celular desde el fluido extracelular. Sin embargo, debido a que los cambios conformacionales en el transportador de glucosa son reversibles, la glucosa puede ser transportada en la dirección opuesta simplemente invirtiendo los pasos de la Figura 13.18. Ese flujo inverso ocurre, por ejemplo, en las células hepáticas, en donde la glucosa se sintetiza y se libera a la circulación.

Canales iónicos

A diferencia de las proteínas transportadoras, las proteínas de canal simplemente forman poros abiertos en la membrana, permitiendo a las moléculas de pequeño tamaño y carga apropiada pasar libremente a través de la bicapa lipídica. Un grupo de proteínas de canal descritas anteriormente son las porinas, que permiten el libre tránsito de iones y moléculas polares pequeñas a través de las membranas externas de las bacterias (véase Fig. 13.10). Las proteínas de canal también permiten el paso de moléculas entre las células conectadas entre sí mediante uniones de tipo «gap», que se tratarán en el Capítulo 14. Las membranas plasmáticas de diversas células animales y vegetales diferentes también contienen proteínas de canal para el agua (**acuaporinas**), a través de las cuales las moléculas de agua pueden cruzar la membrana mucho más rápidamente de lo que pueden difundir a través de la bicapa fosfolipídica (Fig. 13.19). Por lo general, las acuaporinas aumentan el flujo de agua a través de las capas de células epiteliales. En las células vegetales, las acuaporinas desempeñan unos papeles destacados en el transporte ascendente de moléculas de agua en el tallo y en la regulación de la transpiración en las hojas. En las células animales, las acuaporinas mantienen el equilibrio hídrico en el cerebro y expulsan el sudor de la piel. Un rasgo destacado de las acuaporinas es su impermeabilidad a los iones cargados, por lo que permiten el paso libre de moléculas de agua sin alterar el gradiente electroquímico de la membrana plasmática.

Sin embargo, las proteínas de canal mejor caracterizadas son los **canales iónicos**, que intervienen en el tránsito de los iones a través de la membrana plasmática. Aunque los canales iónicos están presentes en las membranas de todas las células, han sido especialmente bien estudiados en el nervio y células musculares, donde su apertura y cierre regulados son los responsable de la transmisión de las señales eléctricas. Tres propiedades de los canales iónicos son fundamentales para su función (Fig. 13.20). En primer lugar, el transporte a través de los canales es extremadamente rápido. Más de un millón de iones por segundo fluyen a través de los canales abiertos —una velocidad de flujo aproximadamente mil veces mayor que la velocidad de transporte mediante proteínas transportadoras—. En segundo lugar, los canales iónicos son altamente selectivos debido a que el estrecho poro del canal restringe el paso a aquellos iones de un tamaño y carga apropiados. De esta manera, proteínas de canal específicas permiten el tránsito de Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^- a través de la membrana. En tercer lugar, la mayoría de los canales iónicos no se encuentran permanentemente abiertos. En su lugar, la



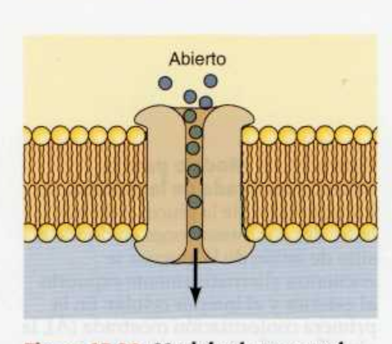


Figura 13.20 Modelo de un canal iónico. En la conformación cerrada, el flujo de los iones está bloqueado por una puerta. La apertura de la puerta permite a los iones fluir rápidamente a través del canal. El canal contiene un poro estrecho que restringe el tránsito a los iones del tamaño y carga apropiados.

apertura de los canales iónicos viene regulada por «puertas» que se abren de forma transitoria en respuesta a estímulos específicos. Algunos canales (denominados **canales regulados por ligando**) se abren en respuesta a la unión de neurotransmisores u otras moléculas señal; otros (denominados **canales regulados por voltaje**) se abren en respuesta a variaciones en el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática.

El papel fundamental que desempeñan los canales iónicos en la transmisión de los impulsos eléctricos fue elucidado a través de una serie de elegantes experimentos publicados por Alan Hodgkin y Andrew Huxley en 1952. Estos investigadores emplearon como modelo las células nerviosas gigantes del calamar. Los axones de estas neuronas gigantes tienen un diámetro de aproximadamente 1 mm, lo que hace posible la inserción de electrodos y la medida de la variación en el potencial de membrana que tiene lugar durante la transmisión de los impulsos nerviosos. Mediante este abordaje, Hodgkin y Huxley demostraron que los cambios en el potencial de membrana se debían a la apertura y cierre regulados de los canales de Na^+ y K^+ en la membrana plasmática. Posteriormente se pudo estudiar la actividad de los canales iónicos individuales empleando la **técnica de *patch clamp*** (o «técnica de registro de zona») desarrollada por Erwin Neher y Bert Sakmann en 1976 (Fig. 13.21). En este método se emplea una micropipeta con un diámetro en la punta de aproximadamente 1 µm para aislar un pequeño trozo de la membrana; esto permite analizar el flujo de los iones a través de un único canal y estudiar con mayor precisión la actividad de los canales iónicos.

El flujo de los iones a través de los canales de membrana depende de que se forme un gradiente iónico a través de la membrana plasmática. Todas las células, incluyendo las células nerviosas y las musculares, tienen bombas iónicas (que se describirán en la siguiente sección) que utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para realizar un transporte activo de iones a través de la membrana plasmática. El resultado es que la composición iónica del citoplasma es sensiblemente diferente a la del fluido extracelular (Tabla 13.1). Por ejemplo, el Na^+ es bombeado activamente fuera de las células mientras que el K^+ es bombeado hacia dentro. Debido a esto, en el axón de calamar la concentración de Na^+ es casi 10 veces más alta en el fluido extracelular que dentro de la célula, mientras que la concentración de K^+ es aproximadamente 20 veces mayor en el citosol que en el medio circundante.

Debido a que los iones están cargados eléctricamente, su transporte supone que se establezca un gradiente eléctrico a través de la membrana. En el axón en reposo del calamar hay un potencial eléctrico de aproximadamente 60 mV a través de la membrana plasmática, siendo el interior de la célula negativo con respecto al exterior celular (Fig. 13.22). Este potencial eléctrico se debe a las bombas iónicas y al flujo de los iones a través de los canales que estén abiertos en la membrana plasmática de la célula en reposo. La

■ **El axón gigante de calamar es aproximadamente 100 veces mayor en su diámetro que los axones típicos de mamíferos. Su gran diámetro permite la transducción de impulsos nerviosos a gran velocidad, lo que es vital para la rápida respuesta de huida de los calamares en presencia de depredadores.**

Tabla 13.1 Concentraciones iónicas extracelulares e intracelulares

	Concentración (m*M*)	
Ión	**Intracelular**	**Extracelular**
Axón de calamar		
K^+	400	20
Na^+	50	450
Cl^-	40–150	560
Ca^{2+}	0,0001	10
Célula de mamífero		
K^+	140	5
Na^+	5–15	145
Cl^-	4	110
Ca^{2+}	0,0001	2,5–5

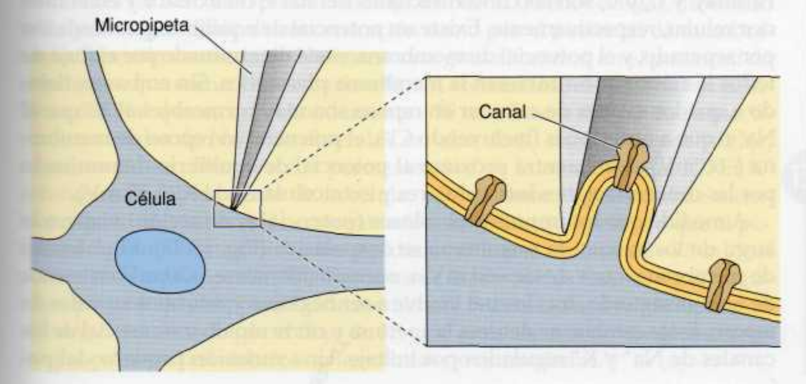


Figura 13.21 Técnica de *patch-clamp* (o de registro de zona). Se aísla un pequeño trozo de membrana en la punta de una micropipeta. Entonces se puede aplicar un estímulo desde dentro de la pipeta, lo que permite medir el comportamiento del canal atrapado. (Adaptado de E. Neher y B. Sakmann, 1992. *Sci. Am.* 266(3): 44.)

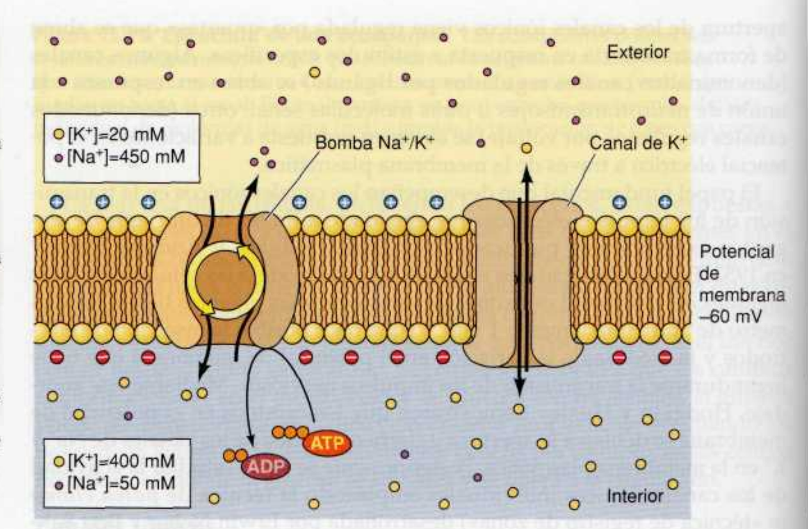


Figura 13.22 Gradientes iónicos y potencial de membrana en reposo del axón de calamar gigante. Solamente se representan las concentraciones de Na^+ y K^+ debido a que éstos son los iones que actúan en la transmisión del impulso nervioso. El Na^+ es bombeado fuera de la célula, mientras que el K^+ es bombeado hacia el interior, por lo que la concentración de Na^+ es superior en el exterior que en el interior del axón, y la concentración de K^+ es mayor dentro que fuera. La membrana en reposo es más permeable al K^+ que al Na^+ u otros iones porque contiene canales de K^+ abiertos. El flujo de K^+ a través de estos canales supone una mayor aportación al potencial de membrana en reposo de –60 mV, que estará próximo al potencial de equilibrio del K^+.

■ **Se cree que las concentraciones disminuidas del neurotransmisor serotonina en las sinapsis neuronales, juegan un papel clave en la depresión clínica. Los medicamentos como el Prozac, que se emplean para el tratamiento de la depresión, son inhibidores selectivos de la reabsorción de serotonina (SSRI: *selective serotonin re-uptake inhibitors*). Como el propio nombre indica, los SSRI bloquean selectivamente la acción de los transportadores responsables de la reabsorción de serotonina por parte de la neurona presináptica, dando lugar a concentraciones aumentadas de serotonina en la sinapsis.**

membrana plasmática de los axones en reposo de calamar contiene canales de K^+ abiertos, por lo que es más permeable al K^+ que al Na^+ o a otros iones. Como consecuencia, el flujo de K^+ supone la principal aportación al potencial de membrana en reposo.

Como se describió en el Capítulo 11, el flujo de los iones a través de la membrana está dirigido tanto por el componente de la concentración como por el componente del voltaje de un gradiente electroquímico. Por ejemplo, la concentración 20 veces superior de K^+ en el interior del axón de calamar medio extracelular dirige el flujo de K^+ hacia el exterior celular. Sin embargo, debido a que el K^+ se encuentra cargado positivamente, este flujo de K^+ desde la célula genera un potencial eléctrico a través de la membrana encontrándose el interior de la célula cargado negativamente. Este potencial de membrana se opone al flujo continuo de K^+ hacia el exterior de la célula, por lo que el sistema alcanza el estado de equilibrio en el que el potencial de membrana contrarresta al gradiente de concentración del K^+.

Cuantitativamente, la relación entre la concentración iónica y el potencial de membrana viene dada por la **ecuación de Nernst**:

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

donde V es el potencial de equilibrio en voltios, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, z es la carga del ión, F es la constante de Faraday, y C_o y C_i son las concentraciones del ión en el exterior y en el interior celular, respectivamente. Existe un potencial de equilibrio para cada ión por separado, y el potencial de membrana viene determinado por el flujo de todos los iones que atraviesan la membrana plasmática. Sin embargo, debido a que los axones de calamar en reposo son más permeables al K^+ que al Na^+ o que a otros iones (incluyendo Cl^-), el potencial en reposo de membrana (–60 mV) se encuentra próximo al potencial de equilibrio determinado por las concentraciones intracelulares y extracelulares de K^+ (–75 mV).

A medida que los impulsos nerviosos (**potenciales de acción**) viajan a lo largo de los axones, la membrana se despolariza (Fig. 13.23). El potencial de membrana varía desde –60 mV a, aproximadamente, +30 mV en menos de un milisegundo, tras lo cual vuelve a ser negativo y retorna a su valor de reposo. Estos cambios se deben a la apertura y cierre rápido y secuencial de los canales de Na^+ y K^+ regulados por voltaje. Una variación pequeña del po-

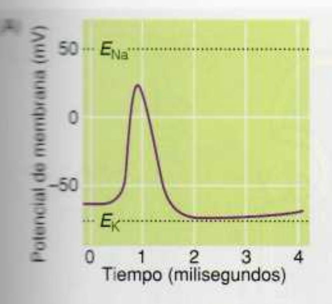


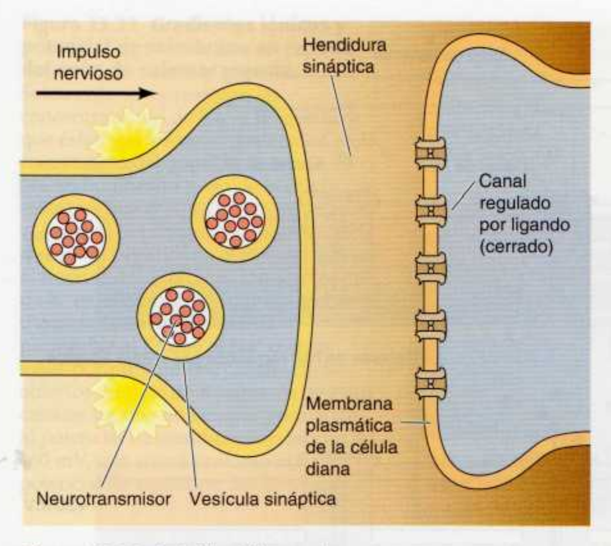
Figura 13.23 Potencial de membrana y canales iónicos durante un potencial de acción. (A) Variación del potencial de membrana en un punto del axón gigante de calamar después de un estímulo. E_{Na} y E_K son los potenciales de equilibrio para el Na^+ y el K^+, respectivamente. (B) Primero, el potencial de membrana aumenta a medida que se abren los canales de Na^+ regulados por voltaje. Después, el potencial de membrana cae por debajo de su valor de reposo a medida que los canales de Na^+ se inactivan y los canales de K^+ regulados por voltaje se abren. Entonces los canales de K^+ regulados por voltaje se inactivan, y el potencial de membrana retorna a su valor de reposo.

tencial de membrana (de −60 mV a −40 mV) provoca la rápida apertura de los canales de Na^+. Esto permite el flujo de Na^+ al interior celular, motivado tanto por su gradiente de concentración como por el potencial de membrana. La repentina entrada de Na^+ causa una gran alteración en el potencial de membrana, que aumenta a cerca de +30 mV, acercándose al potencial de equilibrio del Na^+ que es aproximadamente +50 mV. En ese momento se inactivan los canales de Na^+ y se abren los canales de K^+ regulados por voltaje, aumentando sensiblemente la permeabilidad de la membrana al K^+. El K^+ entonces sale rápidamente de la célula, debido tanto al potencial de membrana como al gradiente de concentración del K^+, lo que provoca que el potencial de membrana descienda rápidamente hasta valores de −75 mV (el potencial de equilibrio del K^+). Entonces se inactivan los canales de K^+ regulados por voltaje y el potencial de membrana retorna a su nivel de reposo de −60 mV, determinado por el flujo de K^+ y de otros iones a través de los canales que permanecen abiertos en las células no estimuladas.

13.1 Animación web

Una sinapsis química

La llegada de un impulso nervioso al final de una neurona, desencadena la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, liberando así los neurotransmisores.



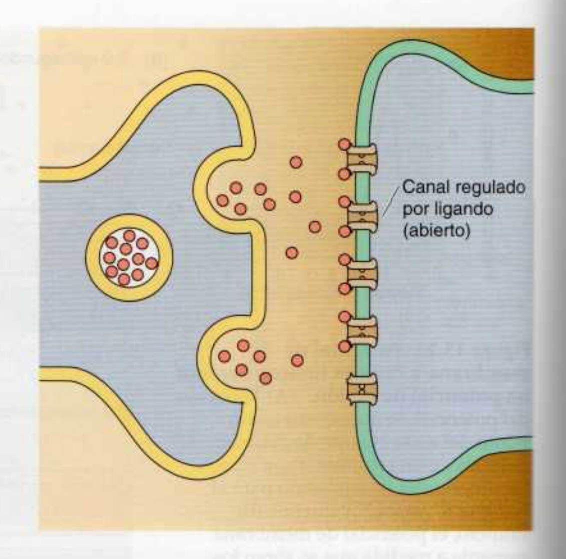


Figura 13.24 Señalización por la liberación de neurotransmisores en una sinapsis. La llegada de un impulso nervioso al terminal de una neurona es una señal que induce la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, lo que da lugar a la liberación del neurotransmisor desde la célula presináptica a la hendidura sináptica. El neurotransmisor se une a los receptores y abre los canales iónicos regulados por ligando en la membrana plasmática de la célula diana.

La despolarización de las regiones adyacentes de la membrana plasmática permite a los potenciales de acción viajar a lo largo de los axones de las células nerviosas como señales eléctricas, dando como resultado la rápida transmisión de los impulsos nerviosos a través de largas distancias. Por ejemplo, los axones de las motoneuronas humanas pueden medir más de un metro de longitud. La llegada de los potenciales de acción a los terminales de la mayoría de las neuronas señala la liberación de neurotransmisores, como la acetilcolina, que portan las señales entre las células en la sinapsis (Fig. 13.24). Los neurotransmisores liberados desde las células presinápticas se unen a receptores en la membrana de las células postsinápticas, donde inducen la apertura de los canales iónicos regulados por voltaje. Uno de los canales mejor conocidos es el receptor de la acetilcolina de las células musculares. La unión de la acetilcolina abre un canal que es permeable tanto al Na^+ como al K^+. Esto permite la entrada rápida del Na^+ que despolariza la membrana de la célula muscular y dispara un potencial de acción. El potencial de acción causa la apertura de los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje, lo que produce un aumento del Ca^{2+} intracelular, que será la señal para la contracción (véase Fig. 12.28).

El receptor de la acetilcolina, aislado inicialmente a partir del órgano eléctrico de la raya *Torpedo* en los años 70, es el prototipo de los canales regulados por ligando. Todos los receptores nicotínicos de acetilcolina se componen de cinco subunidades que se disponen en la membrana a modo de un cilindro (Fig. 13.25). Se cree que en su estado cerrado, el poro del canal se encuentra bloqueado por las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos. La unión de la acetilcolina induce un cambio conformacional en el receptor de forma que estas cadenas laterales hidrofóbicas dejan de estar en el canal, abriendo un poro que permite el paso de los iones con carga po-

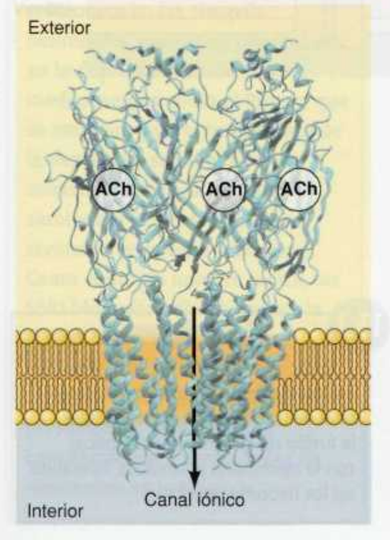
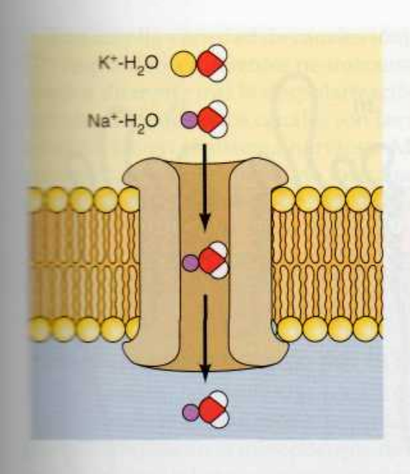


Figura 13.25 Modelo del receptor nicotínico de acetilcolina. En las células de mamífero, el receptor se compone de cinco subunidades (cada una de ellas dotada de cuatro dominios transmembrana) que se disponen alrededor de un poro central. En la figura se representan tres de estas subunidades. La unión de la acetilcolina a sitios de la porción extracelular del receptor induce un cambio alostérico que provoca la apertura de la puerta del canal iónico. (Adaptado de J. P. Changeaux y A. Taly, 2008. *Trends. Mol. Med.* 14: 94.)



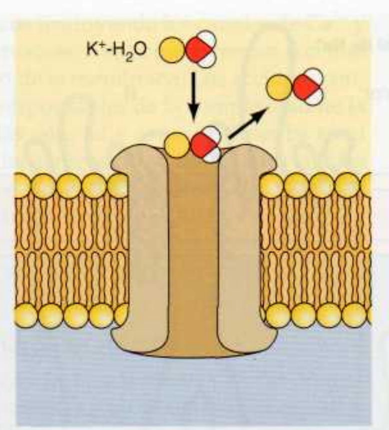


Figura 13.26 Selectividad iónica de los canales de Na^+. Un poro estrecho permite el paso del Na^+ unido a una única molécula de agua, pero impide el paso del K^+ o de iones mayores.

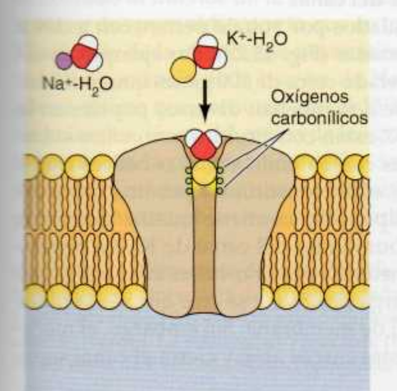
sitiva, incluyendo Na^+ y K^+. *Sin embargo, el canal permanece impermeable* a los iones con carga negativa, como el Cl^-, debido a que está recubierto por aminoácidos cargados negativamente.

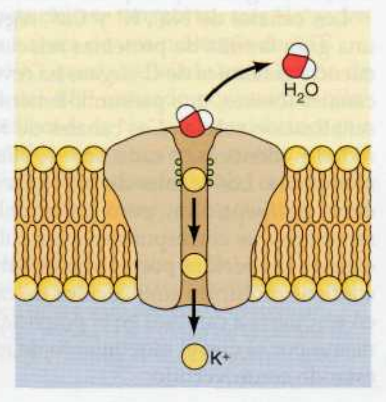
Los canales de Na^+ y K^+ regulados por voltaje presentan un mayor grado de selectividad iónica. Los canales de Na^+ son más de 10 veces más permeables al Na^+ que al K^+, mientras que los canales de K^+ son más de mil veces más permeables al K^+ que al Na^+. La selectividad del canal de Na^+ se puede explicar, al menos en parte, mediante la presencia de un poro estrecho que actúa como un filtro de tamaño. El radio iónico del Na^+ (0,95 Å) es más pequeño que el del K^+ (1,33 Å), y se cree que el poro del canal de Na^+ es lo suficientemente estrecho como para impedir el paso del K^+ o de iones más grandes (Fig. 13.26).

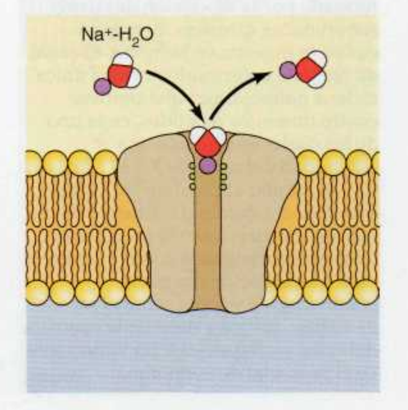
Los canales de K^+ también tienen poros estrechos, que impiden el paso de los iones mayores. Sin embargo, ya que el Na^+ tiene un radio iónico más pequeño, esto no explica la permeabilidad selectiva de estos canales hacia el K^+. La selectividad del canal de K^+ se basa en un mecanismo diferente, que fue elucidado al determinarse la estructura tridimensional de un canal de K^+ por cristalografía de rayos X en 1998 (Fig. 13.27). El poro del canal contiene un filtro selectivo estrecho que está delimitado por oxígenos carbonílicos (C=O) del esqueleto polipeptídico. Cuando un ion K^+ entra en el filtro de selección interacciona con estos oxígenos carbonílicos, y las moléculas de agua a las que estaba unido el K^+ se desplazan, lo que permite al K^+ deshidratado pasar a través del poro. Sin embargo, un Na^+ deshidratado

■ **Los receptores de ácido nicotínico se denominan así porque responden a la nicotina. La nicotina se une al receptor y mantiene al canal en su conformación abierta. Las moléculas que bloquean la actividad de los receptores de nicotina acetilcolina son potentes neurotoxinas; éstas incluyen varias toxinas del veneno de serpientes y el curare.**

Figura 13.27 Selectividad de los canales de K^+. El canal de K^+ contiene un filtro selectivo estrecho, delimitado por átomos de oxígeno carbonílico (C=O). El poro es lo suficientemente ancho como para permitir el paso de K^+ deshidratado, del cual han sido desplazadas todas las moléculas de agua asociadas debido a las interacciones entre el K^+ y estos átomos de oxígeno carbonílico. El Na^+ es demasiado pequeño para interaccionar con los grupos cetónicos del filtro selectivo, por lo que permanece unido al agua en un complejo que es demasiado grande para pasar a través del poro del canal.







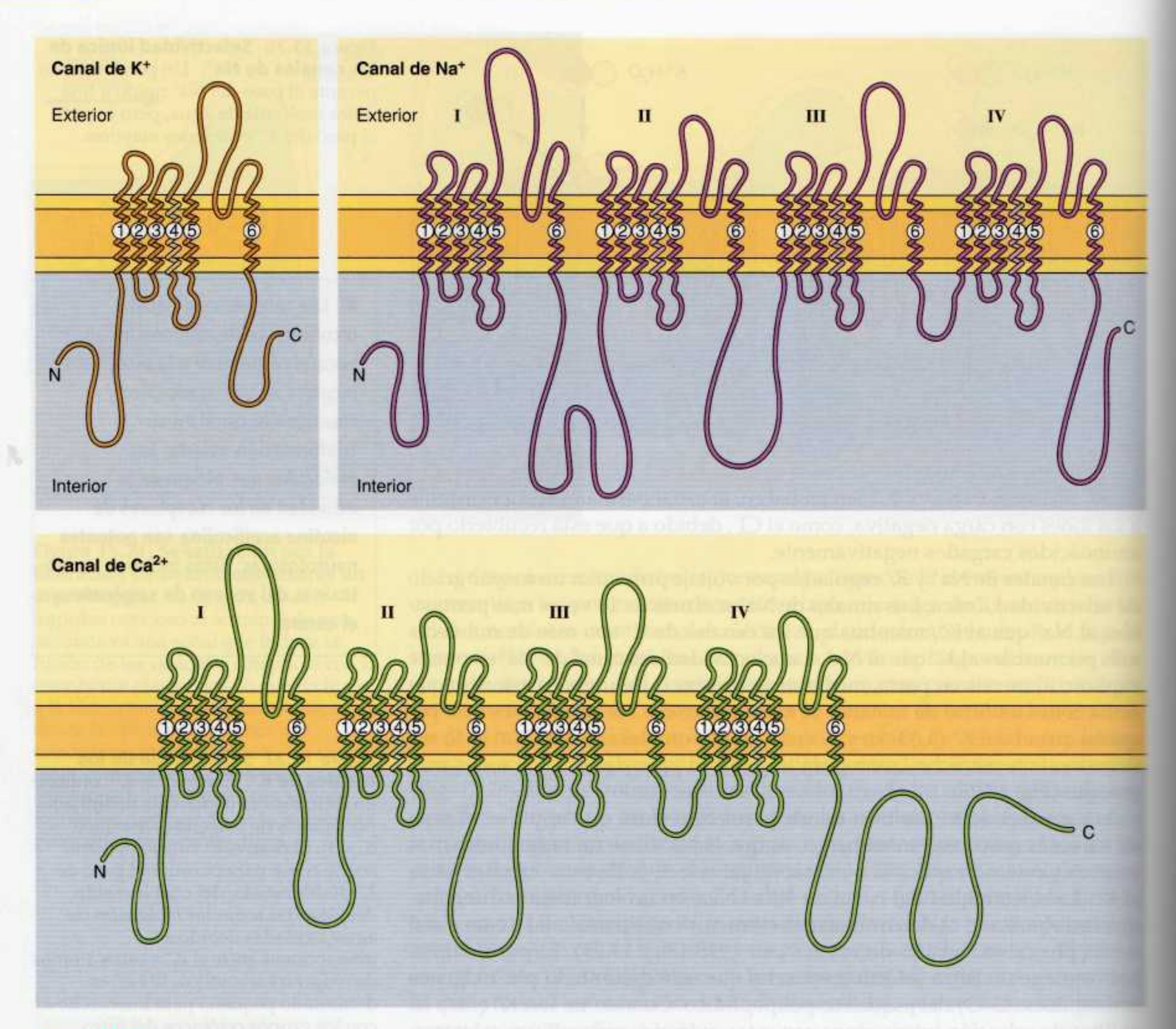


Figura 13.28 Estructuras de los canales catiónicos regulados por voltaje. Los canales de K^+, Na^+ y Ca^{2+} pertenecen a una familia de proteínas relacionadas. El canal de K^+ está formado por la asociación de cuatro subunidades idénticas, una de las cuales se muestra en la figura. El canal de Na^+ está constituido por una única cadena polipeptídica que contiene cuatro dominios repetidos, cada uno de los cuales es similar a una subunidad del canal de K^+. El canal de Ca^{2+} es similar al canal de Na^+. Cada subunidad o dominio contiene seis α-hélices que atraviesan la membrana. La α-hélice designada como 4 contiene varios aminoácidos cargados positivamente y actúa como el sensor de voltaje que interviene en la apertura del canal en respuesta a las variaciones en el potencial de membrana.

es demasiado pequeño para interaccionar con estos oxígenos carbonílicos en el filtro selectivo, el cual se mantiene abierto. Como consecuencia, el Na^+ permanece unido a las moléculas de agua en un complejo hidratado que es demasiado grande para pasar a través del canal.

Los canales de Na^+, K^+ y Ca^{2+} regulados por voltaje pertenecen todos a una gran familia de proteínas relacionadas (Fig. 13.28). Por ejemplo, la secuencia genómica de *C. elegans* ha revelado cerca de 200 genes que codifican canales iónicos, que presumiblemente desempeñan diversos papeles en la señalización celular. Los canales de K^+ están constituidos por cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas conteniendo varias α-hélices transmembrana. Los canales de Na^+ y Ca^{2+} están constituidos por una única cadena polipeptídica, pero cada polipéptido contiene cuatro dominios repetidos que corresponden a las subunidades del canal de K^+. La regulación de la apertura por voltaje está mediada por la α-hélice número 4, que contiene múltiples aminoácidos de carga positiva y se cree que se desplaza en respuesta a cambios en el potencial de membrana. Sin embargo, el mecanismo por el que el movimiento de estas cargas abre y cierra el canal sigue estando controvertido.

Una amplia variedad de canales iónicos (incluyendo los canales de Ca^{2+} y Cl^-) responden a diferentes neurotransmisores, o se abren y cierran con una cinética diferente tras la despolarización de la membrana. Las acciones concertadas de todos estos canales son las responsables de la complejidad de la señalización en el sistema nervioso. Más aún, tal y como se describe en el próximo capítulo, el papel de los canales iónicos no se limita a las células eléctricamente excitables del nervio y del músculo; también desempeñan un papel crítico en la señalización en otros tipos de células. Por tanto, la apertura y el cierre regulados de los canales iónicos proporciona a las células un mecanismo sensible y versátil para responder a diversos estímulos ambientales.

Transporte activo dirigido por la hidrólisis de ATP

El flujo neto de las moléculas por difusión facilitada, tanto a través de proteínas transportadoras como de proteínas de canal, siempre es energéticamente favorable en la dirección que determine el gradiente electroquímico a través de la membrana. Sin embargo, en muchos casos, la célula debe transportar moléculas en contra de su gradiente de concentración. En el **transporte activo**, se utiliza la energía proporcionada por otra reacción acoplada (como la hidrólisis de ATP) para dirigir el transporte de las moléculas en la dirección energéticamente desfavorable.

Las **bombas iónicas**, que son las responsables de mantener el gradiente iónico a través de la membrana plasmática, son un buen ejemplo de transporte activo dirigido directamente por la hidrólisis de ATP. Como ya se mencionó anteriormente (véase Tabla 13.1), la concentración de Na^+ es aproximadamente diez veces superior fuera que dentro de las células, mientras que la concentración de K^+ es mayor dentro que fuera. Estos gradientes iónicos se mantienen por la **bomba de Na^+-K^+** (también llamada la **ATPasa Na^+-K^+**) (Fig. 13.29), que utiliza la energía derivada de la hidrólisis de ATP para transportar Na^+ y K^+ contra sus gradientes electroquímicos. Este proceso es el resultado de una serie de cambios conformacionales de la bomba, dirigidos por el ATP (Fig. 13.30). En primer lugar, los iones Na^+ se unen a sitios de alta afinidad dentro de la célula. Esta unión estimula la hidrólisis de ATP y la fosforilación de la bomba, lo que induce un cambio conformacional que expone los sitios de unión de Na^+ al exterior de la célula y reduce su afinidad por el Na^+. Como consecuencia, el Na^+ fijado se libera en los fluidos extracelulares. Al mismo tiempo, los sitios de unión de K^+ de alta afinidad se exponen sobre la superficie celular. La unión de K^+ extracelular a estos sitios estimula entonces la hidrólisis del grupo fosfato unido a la bomba, lo que induce un segundo cambio conformacional, exponiendo los sitios de unión de K^+ al citosol y disminuyendo su afinidad, por lo que el K^+ es liberado al interior de la célula. La bomba tiene tres sitios de unión para el Na^+ y dos para el K^+, por lo que en cada ciclo se tansportan tres Na^+ y dos K^+ a través de la membrana plasmática a costa de una molécula de ATP.

La importancia de la bomba de Na^+-K^+ queda reflejada en el hecho de que se estima que consume casi el 25% del ATP utilizado por muchas células animales. Un papel crítico de los gradientes de Na^+ y K^+ establecidos por la bomba es la propagación de las señales eléctricas en el nervio y en el músculo. Como se describe a continuación, el gradiente de Na^+ establecido por la bomba también se emplea para dirigir el transporte activo de otras

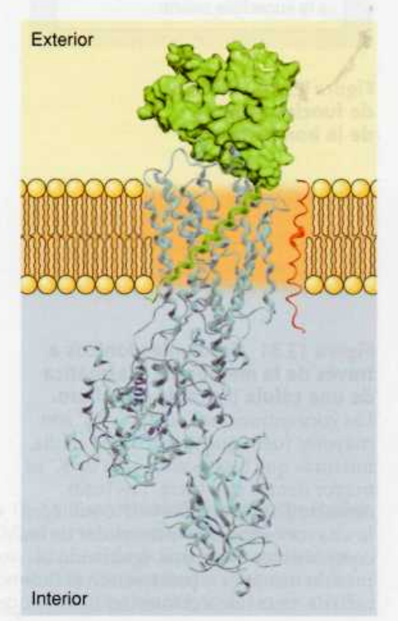


Figura 13.29 Estructura de la bomba de Na^+-K^+. La bomba de Na^+-K^+ es un heterodímero que consta de 10 subunidades α con dominio transmembrana (azul) y una subunidad β con un dominio transmembrana y un dominio extracelular amorfo (verde). La subunidad γ asociada (rojo) regula la actividad de la bomba de forma específica en cada tejido. (Adaptado de J. P. Morth, et al., 2007. *Nature* 450: 1043.)

Exterior

Interior

3 Na^+

3 Na^+ se unen a sitios expuestos dentro de la célula

ATP

ADP

La unión del Na^+ estimula la fosforilación ATP-dependiente de la bomba

3 Na^+

Tras la fosforilación, los sitios de unión del Na^+ quedan expuestos a la superficie celular y disminuye su afinidad, por lo que el Na^+ se libera al exterior de la célula

2 K^+

Al mismo tiempo, 2 K^+ se unen a sitios de alta afinidad expuestos a la superficie celular

La unión del K^+ estimula la desfosforilación de la bomba

2 K^+

La bomba entonces recupera su conformación original liberando K^+ al interior de la célula

Figura 13.30 Modelo de funcionamiento de la bomba Na^+-K^+.

moléculas. Otro papel importante de la bomba Na^+-K^+ en la mayoría de las células animales es mantener el equilibrio osmótico y el volumen celular. El citoplasma contiene una alta concentración de moléculas orgánicas, incluyendo macromoléculas, aminoácidos, azúcares y nucleótidos. En ausencia de algo que lo compense, esto provocaría un flujo de agua hacia el interior por ósmosis, que si no fuera controlado provocaría que la célula se hinchara y, en última instancia, explotara. La compensación requerida la proporciona el gradiente iónico establecido por la bomba de Na^+-K^+ (Fig. 13.31). Concretamente, la bomba establece una mayor concentración de Na^+ en el exterior que en el interior de la célula. Además, como ya se ha descrito, el flujo de K^+ a través de los canales abiertos genera un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática. Este potencial de membrana, a su vez, dirige al Cl^- fuera de la célula, por lo que la concentración de Cl^- (como la del Na^+) es

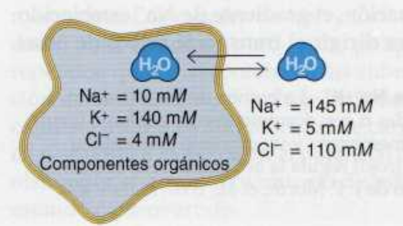


Figura 13.31 Gradientes iónicos a través de la membrana plasmática de una célula típica de mamífero. Las concentraciones de Na^+ y Cl^- son mayores fuera que dentro de la célula, mientras que la concentración de K^+ es mayor dentro que fuera. Las bajas concentraciones de Na^+ y Cl^- equilibran la alta concentración intracelular de los componentes orgánicos, igualando la presión osmótica y previniendo el flujo neto de agua hacia el interior.

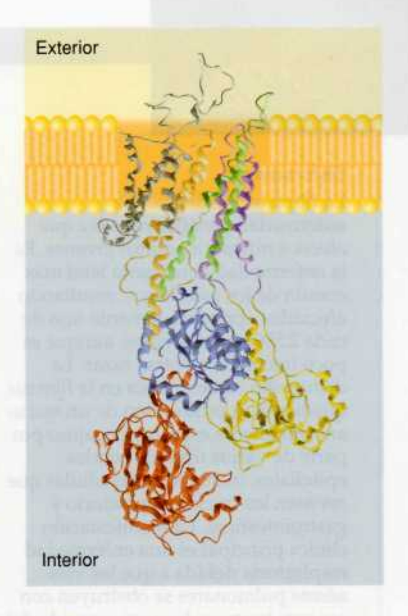


Figura 13.32 Estructura de la bomba de Ca^{2+}. Las subunidades citosólicas de la bomba de Ca^{2+} se representan en rojo, azul y amarillo, mientras que las subunidades transmembrana se muestran en marrón claro, verde y violeta. (Adaptado de C. Olesen, et al., 2007. *Nature* 450: 1037.)

casi diez veces mayor en el fluido extracelular que en el citoplasma. Estas diferencias en la concentración iónica equilibran la elevada concentración de las moléculas orgánicas dentro de las células, igualando la presión osmótica y previniendo el flujo neto de agua hacia el interior.

El transporte activo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática es dirigido por una bomba de Ca^{2+} que está relacionada estructuralmente con la bomba de Na^+-K^+, y que también es impulsada por la hidrólisis de ATP (Fig. 13.32). Las bombas de calcio transportan iones Ca^{2+} del citoplasma al exterior celular o a la luz del RE, por lo que las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} son extremadamente bajas: aproximadamente 0,1 μM respecto a la concentración extracelular de casi 1 mM. Esta concentración intracelular de Ca^{2+} tan baja hace que la célula sea sensible a pequeños incrementos en el nivel de Ca^{2+} intracelular. Este incremento transitorio del Ca^{2+} intracelular desempeña un papel importante en la señalización celular, como ya se mencionó al hablar de la contracción muscular (véase Fig. 12.28) y como se tratará con más detalle en el Capítulo 15.

En las membranas plasmáticas de bacterias, levaduras y células vegetales, las responsables del transporte activo de H^+ fuera de la célula son unas bombas iónicas similares. Además, el H^+ es bombeado de forma activa hacia fuera en las células que recubren el estómago, produciendo la acidez de los fluidos gástricos. Las responsables del transporte activo de H^+ al interior de los lisosomas y de los endosomas son bombas estructuralmente distintas (véase Fig. 10.42). Todavía un tercer tipo de bomba de H^+ es la ATP sintetasa de mitocondrias y cloroplastos. En este caso se puede considerar que la bomba opera en el sentido contrario, utilizando el movimiento de los iones en contra del gradiente electroquímico para dirigir la síntesis de ATP.

La mayor familia de transportadores de membrana está constituida por los **transportadores ABC**, llamados así porque se caracterizan por unos dominios de unión a ATP altamente conservados, o cajas de unión a ATP (*ATP-binding cassettes*) (Fig. 13.33). Se han identificado más de 100 miembros de esta familia tanto en células procarióticas como en eucarióticas; en *E. coli* se conocen 79 genes que codifican transportadores y en el ser humano existen al menos 48 de estos genes. Todas emplean la energía derivada

13.2 Animación web

Bomba de Na^+-K^+

Los gradientes de iones sodio y potasio a través de la membrana plasmática se mantienen por la acción de la bomba Na^+-K^+ que hidroliza el ATP para mantener el transporte de estos iones en contra de sus gradientes electroquímicos.

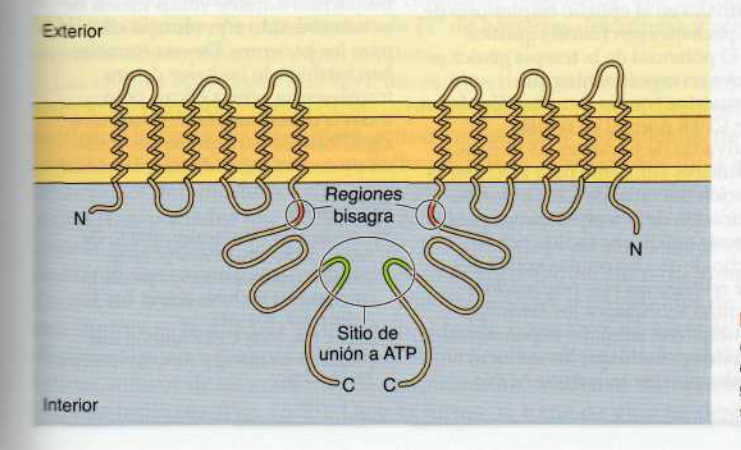
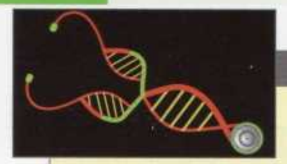


Figura 13.33 Estructura de un transportador ABC. Muchos transportadores ABC son dímeros, donde cada polipéptido consiste en seis dominios transmembrana conectados vía una región bisagra a un casete de unión a ATP.



MEDICINA MOLECULAR

Fibrosis quística

Enfermedad

La fibrosis quística es una enfermedad genética recesiva que afecta a niños y a adultos jóvenes. Es la enfermedad hereditaria letal más común de los caucásicos, resultando afectados aproximadamente uno de cada 2.500 nacidos vivos, aunque es poco frecuente en otras razas. La disfunción característica en la fibrosis quística es la producción de un *mucus* anormalmente espeso y pegajoso por parte de varios tipos de células epiteliales, incluyendo las células que revisten los tractos respiratorio y gastrointestinal. La manifestación clínica principal es una enfermedad respiratoria debida a que las vías aéreas pulmonares se obstruyen con espesos tapones de moco, seguida del desarrollo de infecciones bacterianas recurrentes. En la mayoría de los pacientes, también afecta al páncreas debido a que los conductos pancreáticos están obstruidos por el *mucus*. Las glándulas sudoríparas también funcionan anormalmente, y la presencia de un exceso de sal en el sudor es un carácter diagnóstico de la fibrosis quística.

El tratamiento actual de la enfermedad incluye la terapia física para promover el drenaje bronquial, la administración de antibióticos y la reposición de las enzimas pancreáticas. Aunque este tratamiento ha prolongado la supervivencia de los individuos afectados hasta cerca de los 30 años de edad, la fibrosis quística es finalmente mortal, siendo la enfermedad pulmonar la responsable del 95% de la mortalidad.

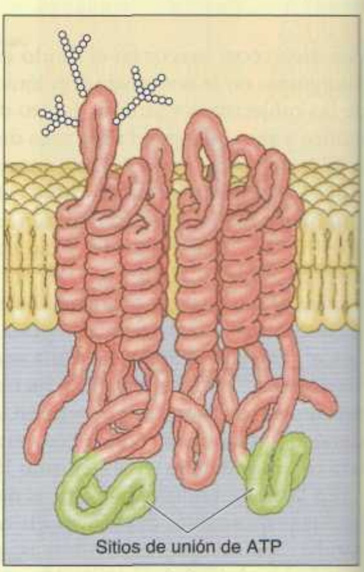
Bases moleculares y celulares

La característica particular de la fibrosis quística es un transporte defectuoso de Cl^- en el epitelio afectado, incluyendo los conductos sudoríparos y las células que revisten el tracto respiratorio. En 1984 se demostró que los canales de Cl^- no funcionaban normalmente en las células epiteliales de los pacientes de fibrosis quística. La base molecular de la enfermedad se aclaró en 1989 al aislarse el gen de la fibrosis quística como un clon molecular. La secuencia del gen reveló que codificaba una proteína denominada CFTR (de *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, regulador transmembrana de la conductancia de la fibrosis quística) que pertenecía a la familia de los transportadores ABC. Varios estudios posteriores demostraron que el CFTR actúa como un canal de Cl^- y que las mutaciones hereditarias responsables de la fibrosis quística provocan un transporte defectuoso de Cl^-. Más del 70% de éstos son una sola mutación puntual en la fenilalanina 508 que impide el plegamiento o el ensamblaje de la proteína.

Prevención y tratamiento

Como ocurre con otras enfermedades hereditarias, el aislamiento del gen de la fibrosis quística abre la posibilidad del estudio genético para identificar a los individuos portadores de alelos mutantes. En algunas poblaciones la frecuencia de portadores heterocigotos de genes mutantes es tan alta como de uno de cada 25 individuos, por lo que sería recomendable realizar un mapeo de la población total para identificar las parejas de riesgo y proporcionar un consejo genético. Además, el descubrimiento de que el CFTR actúa como un canal de Cl^- ha llevado a nuevas aproximaciones al tratamiento. Entre ellas figura la utilización de fármacos que modifican el procesamiento de las proteínas CFTR mutantes o bien estimulan la apertura de otros canales de Cl^- en el epitelio afectado. Alternativamente, la terapia génica permite reemplazar los genes CFTR normales en el epitelio respiratorio de los pacientes con fibrosis quística.

El potencial de la terapia génica se apoya en experimentos que demuestran que la introducción de un gen CFTR normal en células cultivadas de pacientes de fibrosis quística es suficiente para restaurar la función del canal de Cl^-. La posible aplicación de la terapia génica para la fibrosis quística se facilita por el hecho de que las células epiteliales que revisten las vías respiratorias resultan accesibles a los aerosoles. Estudios con animales experimentales han demostrado que los vectores virales pueden transmitir ADNc de CFTR al epitelio respiratorio, y el primer ensayo humano de terapia génica para la fibrosis quística se inició en 1993. Los ensayos hasta la fecha han demostrado que el CFTR ADNc puede transportarse y expresarse de forma segura en las células epiteliales bronquiales de los pacientes con fibrosis quística. A pesar de la mejora de la eficiencia inicialmente baja de la transferencia génica y el mantenimiento de la expresión del ADNc de CFTR transferido durante varios meses, no se han obtenido aún ventajas clínicas para los pacientes. De esta forma se han establecido las bases de una transferencia génica eficaz, pero todavía deben superarse obstáculos significativos para que se desarrolle un protocolo eficaz de terapia génica.



Modelo para el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

Referencias

Proesmas, M., F. Vermeulen, and K. De Boeck. 2008. What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. *Eur. J. Pediatr*. 167: 839–849.

Riordan, J. R. 2008. CFTR funcion and prospects for therapy. *Ann. Rev. Biochem*. 77: 701–726.

de la hidrólisis de ATP para transpotar moléculas en una dirección. En bacterias, la mayoría de los transportadores ABC introducen una amplia gama de nutrientes, incluyendo iones, azúcares y aminoácidos al interior celular, mientras que en células eucariotas transportan sustancias tóxicas al exterior celular. En células eucariotas, el primer transportador ABC se descubrió como el producto de un gen (llamado gen de resistencia a múltiples drogas, o *mdr*) que hace resistentes a las células cancerosas a varios fármacos empleados en quimioterapia. Se han identificado dos transportadores MDR. Se expresan normalmente en varios tipos de células, donde intervienen eliminando compuestos extraños potencialmente tóxicos. Por ejemplo, la expresión de un transportador MDR en las células endoteliales de los capilares cerebrales parece que desempeña un papel importante en la protección del cerebro frente a sustancias químicas tóxicas. Desafortunadamente, se suele alcanzar con frecuencia un alto nivel de expresión de los transportadores MDR en las células cancerosas, donde reconocen a diversos fármacos y los bombean hacia el exterior de las células. Esto hace a las células cancerosas resistentes a un amplio espectro de agentes quimioterapeúticos y supone un obstáculo importante para un tratamiento eficaz del cáncer.

Otro miembro importante, clínicamente hablando, de la familia de transportadores ABC es el gen responsable de la fibrosis quística. El producto de este gen (llamado regulador transmembrana de la conductancia de la fibrosis quística, o CFTR, del inglés *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), aunque es un miembro de la familia ABC, actúa como un canal de Cl^- en las células epiteliales, y la característica de esta enfermedad es un transporte defectuoso del Cl^- . El canal de Cl^- CFTR también es peculiar puesto que parece requerir tanto la hidrólisis de ATP como una fosforilación dependiente de AMPc para poder abrirse. La mayoría de los casos de fibrosis quística son el resultado de una sola mutación puntual en el canal de Cl^-, que interfiere tanto con el plegamiento proteico como con el transporte de Cl^-.

Transporte activo dirigido por gradientes iónicos

Las bombas iónicas y los transportadores ABC descritos en la sección anterior utilizan la energía derivada directamente de la hidrólisis de ATP para transportar moléculas contra sus gradientes electroquímicos. Otras moléculas se transportan en contra de su gradiente de concentración empleando energía derivada no de la hidrólisis de ATP sino de acoplar el transporte de una segunda molécula en la dirección favorable energéticamente. El gradiente de Na^+ que establece la bomba de Na^+-K^+ proporciona una fuente de energía que se emplea con frecuencia para alimentar el transporte activo de azúcares, aminoácidos e iones en las células de mamíferos. Los gradientes de H^+ establecidos por las bombas de H^+ de bacterias, levaduras y células vegetales desempeñan un papel similar.

Las células epiteliales que revisten el intestino proporcionan un buen ejemplo de transporte activo dirigido por el gradiente de Na^+. Estas células emplean sistemas de transporte activo en los dominios apicales de sus membranas plasmáticas para tomar los azúcares y aminoácidos de la dieta desde la luz del intestino. La toma de glucosa, por ejemplo, se lleva a cabo por un transportador que transporta coordinadamente dos iones Na^+ y una glucosa hacia dentro de la célula (Fig. 13.34). El flujo de Na^+ a favor de su gradiente electroquímico proporciona la energía requerida para tomar la glucosa de la dieta y acumular altas concentraciones intracelulares de glucosa. Entonces la glucosa se libera en el tejido conectivo subyacente (que contiene capilares sanguíneos) por la superficie basolateral del epitelio intestinal, a favor de su gradiente de concentración, mediante transporte por difusión facilitada (Fig. 13.35). De esta forma, la toma de glucosa desde la

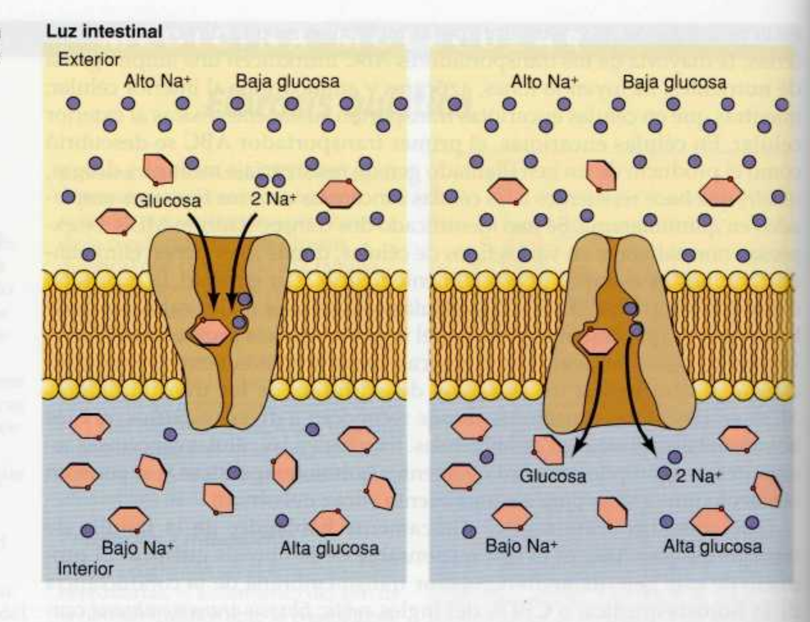


Figura 13.34 Transporte activo de la glucosa. El transporte activo dirigido por el gradiente de Na^+ es el responsable de la entrada de glucosa desde la luz intestinal. El transportador, de forma coordinada, une y transporta una glucosa y dos Na^+ al interior de la célula. El transporte de Na^+ en la dirección energéticamente favorable es el que dirige la entrada de la glucosa contra su gradiente de concentración.

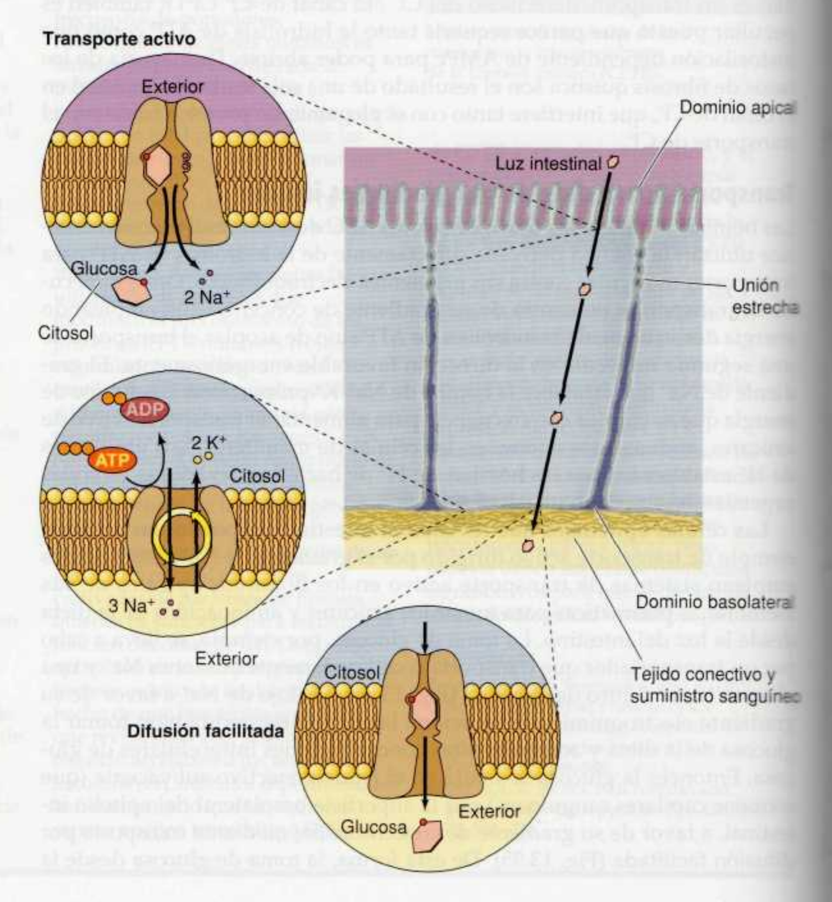


Figura 13.35 Transporte de glucosa por las células epiteliales intestinales. Un transportador en el dominio apical de la membrana plasmática es el responsable de la entrada activa de glucosa (por cotransporte con Na^+) desde la luz intestinal. Como resultado, la glucosa de la dieta es absorbida y concentrada dentro de las células epiteliales intestinales. La glucosa entonces se transfiere desde estas células al tejido conectivo circundante y a la corriente sanguínea a través de difusión facilitada, mediada por un transportador en el dominio basolateral de la membrana plasmática. El sistema es dirigido por la bomba de Na^+-K^+, que también se encuentra en el dominio basolateral. Reseñar que la entrada de glucosa desde el tracto digestivo y su transferencia a la circulación depende de que los transportadores de glucosa de transporte activo y de difusión facilitada se localicen de manera restringida en los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática, respectivamente.

luz intestinal y su liberación a la circulación proporciona un buen ejemplo de la función polarizada de las células epiteliales, que se debe a la localización específica de los transportadores de transporte activo y de difusión facilitada en los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática, respectivamente.

La entrada coordinada de glucosa y Na^+ es un ejemplo de **simporte**, el transporte de dos moléculas en la misma dirección. Por el contrario, la difusión facilitada de glucosa es un ejemplo de **uniporte**, el transporte de una única molécula. El transporte activo también puede tener lugar por **antiporte**, en el que dos moléculas se transportan en direcciones opuestas (Fig. 13.36). Por ejemplo, el Ca^{2+} se exporta desde las células no sólo por la bomba de Ca^{2+} sino también por un antiporte de Na^+-Ca^{2+} que transporta Na^+ hacia dentro de la célula y Ca^{2+} hacia fuera. Otro ejemplo viene dado por la proteína de intercambio de Na^+-H^+, que actúa en la regulación del pH intracelular. El antiportador de Na^+-H^+ acopla el transporte de Na^+ hacia dentro de la célula con la exportación de H^+, y de esta forma elimina el exceso de H^+ producido por las reacciones metabólicas y previene la acidificación del citoplasma.

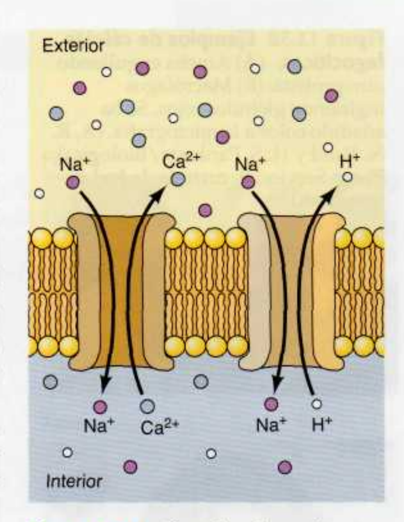


Figura 13.36 Ejemplos de antiporte. El Ca^{2+} y los H^+ se exportan de las células por antiportadores, que acoplan su exportación a un importe energéticamente favorable de Na^+.

Endocitosis

Las proteínas transportadoras y de canal descritas en la sección anterior transportan moléculas pequeñas a través de la bicapa fosfolipídica. Las células eucariotas también son capaces de captar macromoléculas y partículas del medio circundante por un proceso distinto llamado **endocitosis**. En la endocitosis, el material que se va a introducir es rodeado por una porción de la membrana plasmática que luego se invagina para formar una vesícula que contiene el material ingerido. El término «endocitosis» fue acuñado por Christian de Duve en 1963 e incluía tanto la ingestión de partículas grandes (como bacterias) como la entrada de fluidos o macromoléculas en pequeñas vesículas. La primera de estas actividades se conoce como **fagocitosis** (acción celular de comer) y ocurre principalmente en tipos especializados de células. La **pinocitosis** (bebida celular) es una propiedad de todas las células eucariotas y tiene lugar mediante varios mecanismos diferentes.

Fagocitosis

Durante la fagocitosis las células engullen partículas grandes como bacterias, desechos celulares o incluso células intactas (Fig. 13.37). La unión de la partícula a unos receptores sobre la superficie de la célula fagocítica dispara la extensión de seudópodos —un movimiento de la superficie celular—. Los seudópodos acaban rodeando a la partícula y sus membranas se funden para formar una gran vesícula intracelular (>0,25 µm de diámetro) llamada **fagosoma**. Los fagosomas entonces se fusionan con los lisosomas, dando lugar a los **fagolisosomas** en los que el material ingerido se digiere por la acción de las hidrolasas ácidas lisosomales (véase Cap. 10). Durante la maduración del fagolisosoma, alguna de las proteínas de membrana internalizadas se reciclan a la membrana plasmática, como se describe en la siguiente sección para la endocitosis mediada por receptor.

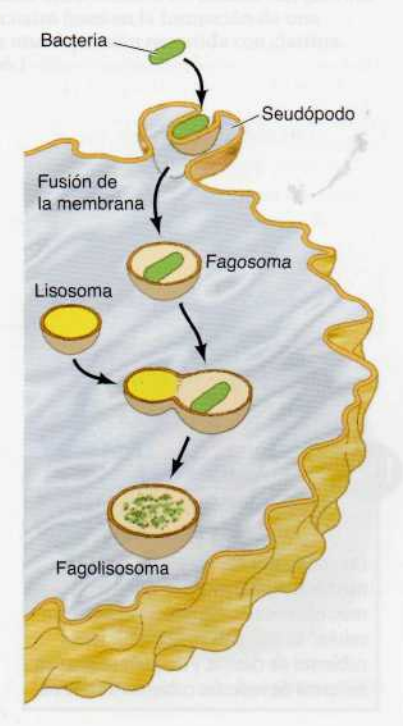
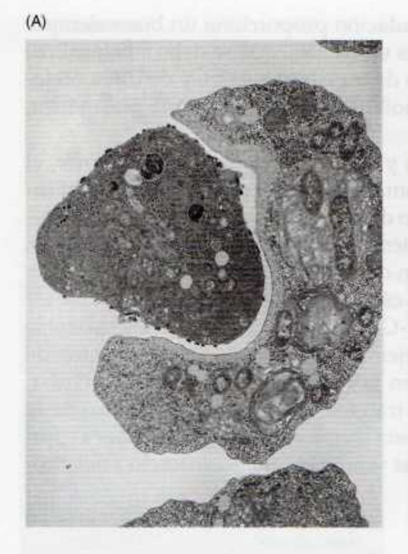


Figura 13.37 Fagocitosis. La unión de una bacteria a la superficie celular estimula la extensión de un seudópodo, que termina por engullir a la bacteria. La fusión de las membranas del seudópodo da como resultado la formación de una gran vesícula intracelular (un fagosoma). El fagosoma se fusiona con los lisosomas para formar un fagolisosoma, dentro del cual se digiere la bacteria ingerida.

Figura 13.38 Ejemplos de células fagocíticas. (A) Ameba engullendo otro protista. (B) Macrófagos ingiriendo glóbulos rojos. Se ha añadido color a la micrografía. (A, R. N. Band y H. S. Pankratz/Biological Photo Service; B, cortesía de Joel Swanson.)

(A)



(B)



13.3 **Animación web**

La endocitosis

En la endocitosis, la membrana plasmática genera pequeñas vesículas (pinocitosis) o grandes vesículas (fagocitosis) para ingerir materias extracelulares.

La ingestión por fagocitosis de partículas grandes desempeña papeles distintos en los diferentes tipos de células (Fig. 13.38). Muchas amebas emplean la fagocitosis para capturar partículas alimenticias, como bacterias u otros protozoos. En los animales pluricelulares los papeles principales de la fagocitosis son proporcionar una defensa contra microorganismos invasores y eliminar células viejas o dañadas del cuerpo. En los mamíferos la fagocitosis es la función principal de dos tipos de glóbulos blancos sanguíneos, macrófagos y neutrófilos, a los que se denomina frecuentemente «fagocitos profesionales». Tanto los macrófagos como los neutrófilos desempeñan un papel crítico en los sistemas de defensa del organismo, eliminando los microorganismos de los tejidos infectados. Adicionalmente, los macrófagos eliminan células envejecidas o muertas de los tejidos a lo largo del cuerpo. Un notorio ejemplo del alcance de esta actividad viene dado por los macrófagos del bazo e hígado humanos, los cuales son responsables de la destrucción diaria de más de 10^{11} células sanguíneas avejentadas.

Endocitosis mediada por receptor

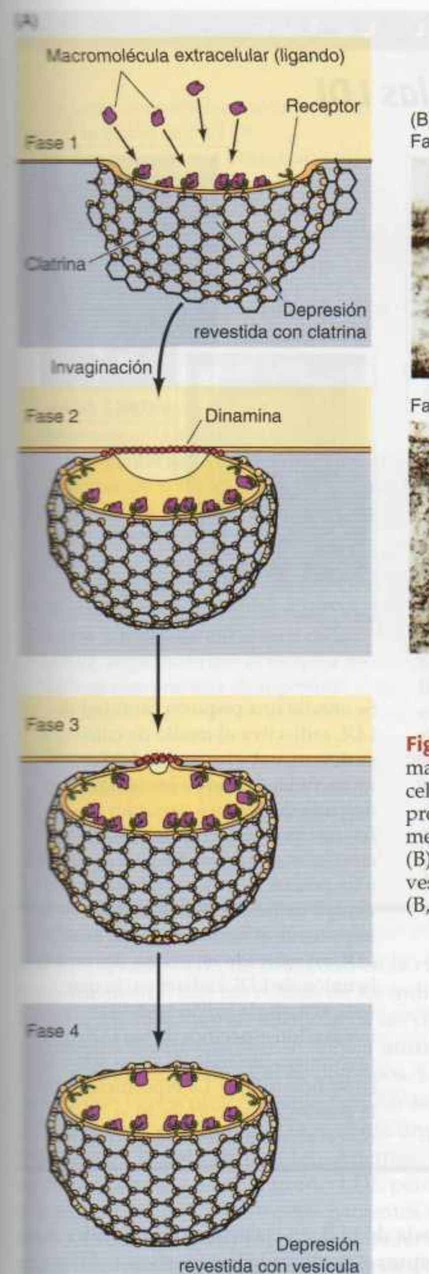
La forma mejor caracterizada de este proceso es la **endocitosis mediada por receptor**, que proporciona un mecanismo para la entrada selectiva de macromoléculas específicas (Fig. 13.39). En primer lugar, las macromoléculas que se van a introducir se unen a receptores específicos de la superficie celular. Estos receptores se acumulan en regiones especializadas de la membrana plasmática denominadas **depresiones revestidas con clatrina**. Con la ayuda de la proteína de unión a GTP asociada a membrana, **dinamina**, estas depresiones se invaginan a partir de la membrana para formar pequeñas **vesículas revestidas con clatrina** que contienen los receptores y sus macromoléculas unidas (**ligandos**). A continuación, las vesículas revestidas con clatrina se fusionan con endosomas tempranos, y su contenido se distribuye bien para transportarse a los lisosomas o bien para reciclarse a la membrana plasmática.

13.4 **Animación web**

Invaginaciones y vesículas cubiertas de clatrina

Las moléculas de receptores de la membrana plasmática se unen a macromoléculas específicas del exterior celular, se agrupan en invaginaciones cubiertas de clatrina, y después se separan en forma de vesículas cubiertas de clatrina.

La captura de colesterol por las células de mamíferos ha proporcionado un modelo clave para comprender la endocitosis mediada por receptor a nivel molecular. El colesterol se transporta a través del torrente sanguíneo en forma de partículas lipoproteínicas, la más común de las cuales se denomina **lipoproteína de baja densidad**, o **LDL**, (del inglés *low-density lipoprotein*) (Fig. 13.40). Los estudios en los laboratorios de Michael Brown y Joseph



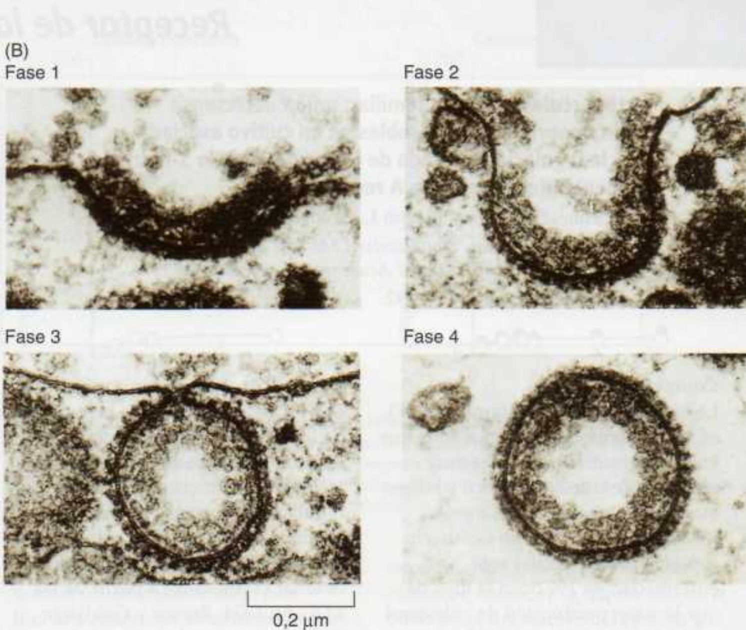


Figura 13.39 Formación de una vesícula revestida con clatrina. (A) Las macromoléculas extracelulares (ligandos) se unen a receptores de la superficie celular que se acumulan en depresiones revestidas con clatrina. Con la ayuda de la proteína de unión a GTP dinamina, estas depresiones se invaginan desde la membrana plasmática para formar vesículas intracelulares revestidas con clatrina. (B) Micrografías electrónicas mostrando cuatro fases en la formación de una vesícula revestida con clatrina a partir de una depresión revestida con clatrina. (B, M. M. Perry, 1979. *J. Cell Science* 34: 266.)

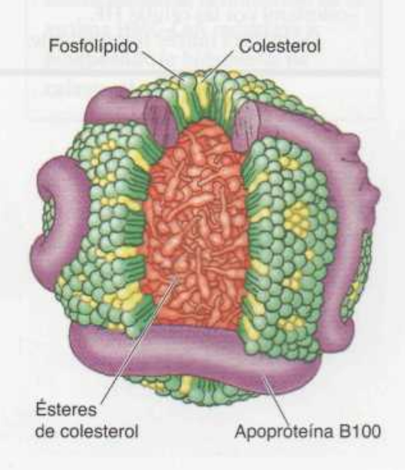


Figura 13.40 Estructura de una LDL. Cada partícula de LDL contiene aproximadamente 1.500 moléculas de ésteres de colesterol en un núcleo de naturaleza lipídica. El núcleo está rodeado por una cubierta que contiene 500 moléculas de colesterol, 800 moléculas de fosfolípido y una molécula de apoproteína B100.

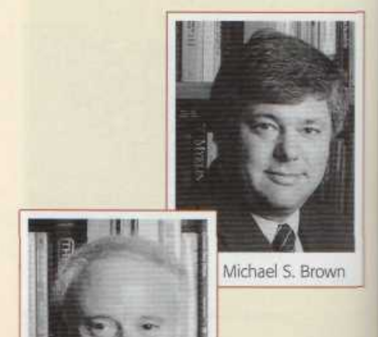


EXPERIMENTO CLAVE

Receptor de las LDL

Hipercolesterolemia familiar: unión defectuosa de lipoproteínas a fibroblastos en cultivo asociada a la regulación alterada de la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa

Michael S. Brown y Joseph L. Goldstein
University of Texas Southwestern Medical School, Dallas
Proceedings of the National Academy of Science USA, 1974
Volumen 71, págs. 788-792


Michael S. Brown

Joseph L. Goldstein

Contexto

La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad genética en la que los pacientes tienen niveles muy elevados de colesterol sérico y sufren ataques de corazón prematuros. Michael Brown y Joseph Goldstein comenzaron a estudiar esta enfermedad en 1972 con la idea de que la superproducción de colesterol se debía a un defecto en los mecanismos de control que normalmente regulan la biosíntesis del colesterol. De forma consecuente con esta hipótesis, encontraron que al añadir LDL al medio de cultivo de fibroblastos normales humanos se inhibía la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), la enzima limitante en la ruta biosintética del colesterol. Por el contrario, la adición de LDL a las células de los pacientes con HF no afecta a la actividad de la HMG-CoA reductasa, lo que da como resultado la superproducción de colesterol por las células HF.

De manera quizás sorprendente, experimentos posteriores indicaron que esta anormalidad en la regulación de la HMG-CoA reductasa no se debía a una mutación en el gen de la HMG-CoA reductasa. En cambio, la regulación anormal de HMG-CoA reductasa parecía que era debida a la incapacidad de las células HF de obtener el colesterol a partir de las LDL. En 1974, Brown y Goldstein demostraron que la lesión de las células HF es un defecto en la unión de las LDL a un receptor de superficie celular. La identificación del receptor de LDL llevó a una serie de experimentos revolucionarios en los que Brown, Goldstein y sus colaboradores describieron la ruta de la endocitosis mediada por receptor.

Experimentos

En su artículo de 1974, Brown y Goldstein publicaron los resultados de experimentos en los que investigaron la unión de LDL, marcado radiactivamente, a fibroblastos tanto de individuos normales como de pacientes con HF. Se añadió una pequeña cantidad de LDL radiactiva al medio de cultivo, y se determinaba la cantidad de radiactividad unida a las células después de tiempos variables de incubación (véase figura). Cantidades crecientes de LDL radiactiva se unían a las células normales en función del tiempo de incubación. Resultaba importante el hecho de que al añadir LDL no marcado en exceso disminuía la unión de LDL radiactiva, lo que indicaba que la unión se debía a una interacción específica de las LDL con un número limitado de sitios sobre la superficie celular. La especificidad de la interacción se corroboró al observarse que cantidades en exceso

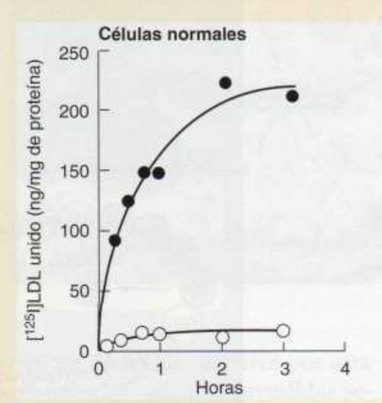
Goldstein demostraron que la entrada de LDL en las células de mamíferos requiere la unión de las LDL a un receptor específico de la superficie celular que se acumula en depresiones revestidas de clatrina y que se introduce por endocitosis. Como se describe en la sección siguiente, el receptor posteriormente se recicla a la membrana plasmática mientras que la LDL se transporta a los lisosomas, donde se libera el colesterol para ser utilizado por la célula.

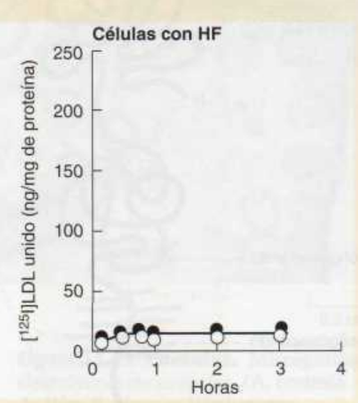
Los datos reveladores acerca de este proceso surgieron a partir de estudios de pacientes con una enfermedad hereditaria conocida como hipercolesterolemia familiar. Los pacientes con esta enfermedad presentan niveles muy altos de colesterol sérico y sufren ataques cardíacos prematuros. Brown y Goldstein hallaron que las células de estos pacientes eran incapaces de introducir LDL desde los fluidos extracelulares, lo que causaba que se acumu-

EXPERIMENTO CLAVE

de otras lipoproteínas no interferían con la unión de las LDL.

En contraste con estos resultados en los fibroblastos normales, las células de pacientes HF no unían LDL radiactiva de manera específica. Por tanto, parecía ser que los fibroblastos normales poseían un receptor específico de LDL que estaba ausente o defectuoso en las células HF. Brown y Goldstein concluyeron que el defecto observado en la unión de las LDL a las células HF «puede representar la alteración genética fundamental de esta enfermedad», justificando la incapacidad de la LDL de inhibir la HMG-CoA reductasa, y la superproducción resultante de colesterol. Experimentos adicionales mostraron que las LDL unidas a los fibroblastos normales están asociadas con la fracción de membrana de la célula, sugiriendo que el receptor de LDL es una proteína de superficie celular.





Transcurso de la unión de LDL radiactiva a células normales y con HF. Las células se incubaron con $[^{125}I]$ LDL radiactiva en presencia (círculos blancos) o ausencia (círculos negros) de un exceso de LDL no marcado. Después se recogieron las células y se determinó la cantidad de LDL radiactiva fijada. Los datos se presentan como nanogramos de LDL unido por miligramo de proteína celular.

Impacto

Tras identificar al receptor de LDL, Brown y Goldstein demostraron que las LDL unidas a la superficie celular rápidamente se introducen y se degradan a colesterol libre en los lisosomas. En colaboración con Richard Anderson establecieron que el receptor de LDL se introduce mediante endocitosis desde depresiones revestidas. Además, sus estudios demostraron que el receptor de LDL se recicla a la membrana plasmática después de disociarse de su ligando dentro de la célula. Unos experimentos que se iniciaron con el objeto de entender la regulación de la biosíntesis del colesterol llevaron a descubrir la ruta principal por la cual las células eucariotas introducen macromoléculas específicas —un ejemplo notorio de la forma en la que la ciencia y los científicos pueden avanzar en nuevas direcciones no previstas.

---

para un elevado nivel de colesterol en la circulación. Experimentos posteriores demostraron que las células de los individuos normales poseen un receptor para las LDL que se acumula en las depresiones revestidas, y que la hipercolesterolemia familiar se debe a mutaciones congénitas del receptor de LDL. Estas mutaciones son de dos tipos. Las células de la mayoría de los pacientes con hipercolesterolemia familiar sencillamente son incapaces de unir LDL, lo que demuestra que se necesita un receptor específico de la superficie celular para la entrada de LDL. Además, se identificaron algunos pacientes en cuyas células se había unido LDL pero eran incapaces de internalizarla. Los receptores de LDL de estos pacientes no se acumulaban en las depresiones revestidas, lo que proporcionaba una evidencia directa del papel central de las depresiones revestidas en la endocitosis mediada por receptor.

■ Las estatinas son una clase importante de medicamentos empleados en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Ejercen su efecto mediante la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa y bloqueando la biosíntesis de colesterol.

Las mutaciones que impiden al receptor de LDL acumularse en las depresiones revestidas se localizan en la cola citoplasmática del receptor y pueden ser tan sutiles como un cambio de tirosina por cisteína (Fig. 13.41). Estudios posteriores han definido la señal de internalización del receptor de LDL como una secuencia de seis aminoácidos, incluyendo la tirosina esencial. En las colas citoplasmáticas de otros receptores captados a través de depresiones revestidas de clatrina, se encuentran señales de internalización similares, incluyendo con frecuencia restos de tirosina. Estas señales de internalización se unen a proteínas adaptadoras, que a su vez se unen a la clatrina en el lado citosólico de la membrana, de manera parecida a como se

Figura 13.41 Receptor de LDL. El receptor de LDL incluye 700 aminoácidos extracelulares, una α-hélice transmembrana de 22 aminoácidos y una cola citoplásmica de 50 aminoácidos. Los 292 aminoácidos del extremo N-terminal constituyen el dominio de unión a LDL. Seis aminoácidos dentro de la cola citoplásmica definen la señal de internalización, que se reconoció por vez primera porque la mutación que determina el cambio de Tyr por Cys en un caso de hipercolesterolemia familiar impide que el receptor se acumule en las depresiones revestidas.

formaban las vesículas revestidas de clatrina durante el transporte de hidrolasas lisosómicas desde la red *trans* del Golgi (véase Fig. 10.36). La clatrina se ensambla en una estructura a modo de cesta que distorsiona la membrana, formando depresiones invaginadas (Fig. 13.42). Una proteína de unión a GTP, denominada dinamina, se dispone en anillos alrededor del cuello de estas depresiones invaginadas, lo que conduce a la liberación de las vesículas revestidas dentro de la célula.

La endocitosis mediada por receptor es una actividad característica de la membrana citoplasmática de las células eucariotas. Se han encontrado más

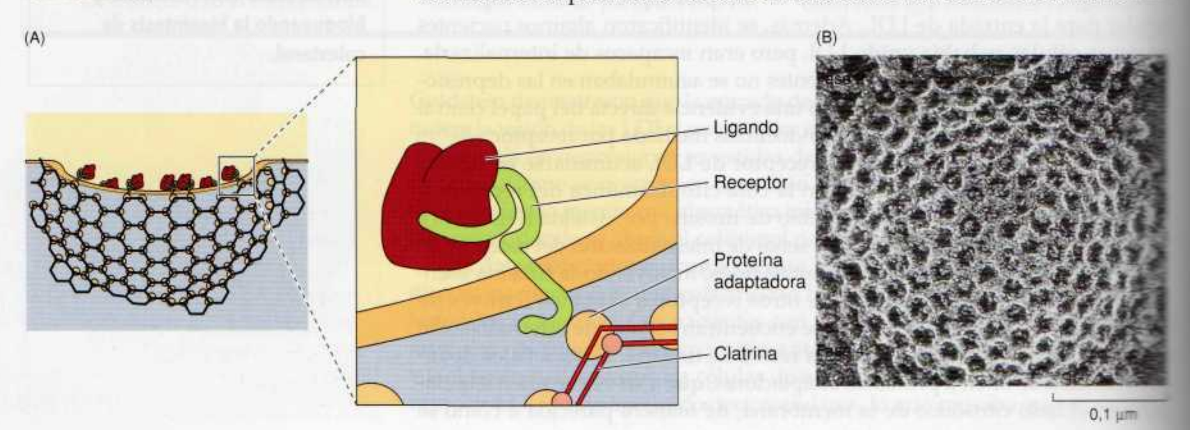
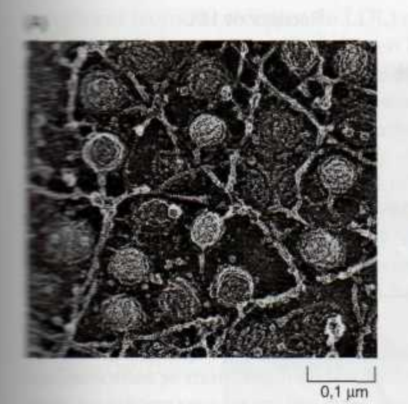


Figura 13.42 Formación de depresiones revestidas de clatrina. (A) Unas proteínas adaptadoras se unen tanto a la clatrina como a las señales de internalización presentes en las colas citoplasmáticas de los receptores. (B) Micrografía electrónica de una depresión revestida de clatrina mostrando la estructura en cesta de la red de clatrina. (B, cortesía de John E. Heuser, Washington University School of Medicine.)



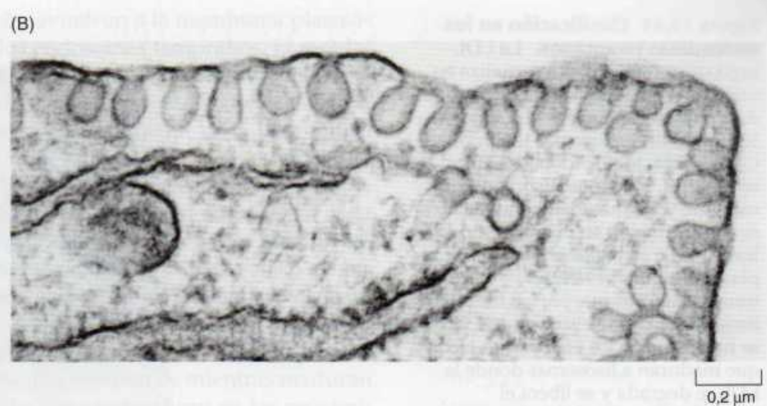


Figura 13.43 Caveolas. Micrografías electrónicas de caveolas. (A, cortesía de John E. Heuser, Washington University School of Medicine; B, cortesía de R. G. W. Anderson, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas.)

de 20 receptores diferentes que se introducen de forma selectiva por esta ruta. También se incorpora fluido extracelular a las vesículas revestidas según se invaginan desde la membrana plasmática, por lo que la endocitosis mediada por receptor provoca la entrada no selectiva del fluido extracelular y de sus contenidos (**endocitosis en fase fluida**), además de la introducción de macromoléculas específicas. Las depresiones revestidas suelen ocupar del 1% al 2% de la superficie de la membrana plasmática y se estima que tienen una vida media de uno a dos minutos. Partiendo de estas cifras, se calcula que la endocitosis mediada por receptor produce la internalización de una superficie celular equivalente a la totalidad de la membrana plasmática aproximadamente cada dos horas.

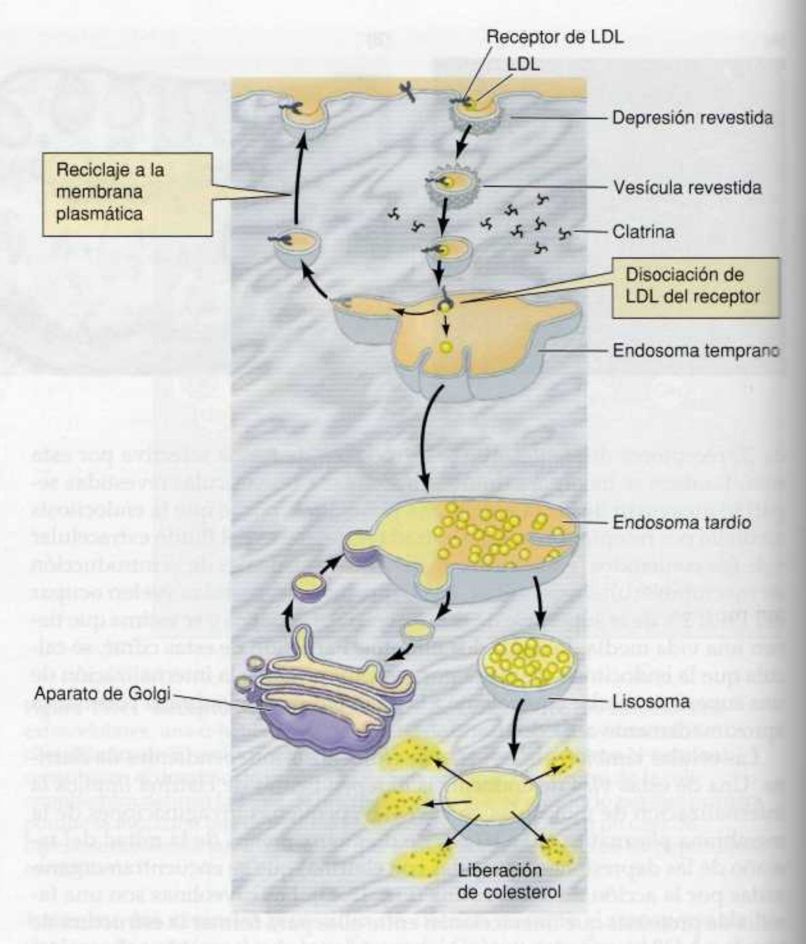
Las células también poseen vías de endocitosis independientes de clatrina. Una de estas vías de endocitosis independientes de clatrina implica la internalización de moléculas en **caveolas**, pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática (50 a 80 nm de diámetro, menos de la mitad del tamaño de las depresiones revestidas con clatrina) que se encuentran organizadas por la acción de la **caveolina** (Fig. 13.43). Las caveolinas son una familia de proteínas que interaccionan entre ellas para formar la estructura de las caveolas. Las caveolas son estructuras relativamente estables y la regulación de su internalización no se conoce bien. Llevan a cabo la endocitosis mediada por receptor mediante receptores transmembrana específicos, pero los lípidos de las caveolas y la propia caveolina también funcionan como «receptores» para la internalización de moléculas específicas, incluida la lipoproteína de alta densidad (HDL). Estudios recientes han demostrado que existen vías de endocitosis adicionales que son independientes tanto de caveolina como de clatrina. Adicionalmente, vesículas grandes (0,15 a 5,0 µm de diámetro) pueden mediar la internalización de fluidos en un proceso denominado **macropinocitosis**. Así, mientras que la endocitosis dependiente de clatrina proporciona claramente una de las principales vías para la internalización de macromoléculas específicas, las células también utilizan varios mecanismos independientes de clatrina.

Tráfico de proteínas en la endocitosis

Tras su internalización, las vesículas revestidas de clatrina se despojan rápidamente de sus revestimientos y se fusionan con **endosomas** tempranos, que son vesículas con extensiones tubulares que se localizan en la periferia de la célula. La fusión de las vesículas endocíticas con los endosomas está mediada por proteínas de unión a Rab GTP, sus efectores y parejas complementarias de proteínas transmembrana de la vesícula y las membranas diana (proteínas SNARE) (véase Fig. 10.39). Los endosomas tempranos son un compartimento de clasificación (en ocasiones reciben el nombre de endoso-

■ **Ciertas toxinas proteicas bacterianas, como la toxina *colérica*, se *unen* a las glicoproteínas que se encuentran en las balsas lipídicas y son internalizadas por endocitosis. Una vez en el interior de vesículas endocíticas, la toxina toma el mando de la vía secretora para acceder al citoplasma, donde ejerce su efecto tóxico.**

Figura 13.44 Clasificación en los endosomas tempranos. La LDL unida a su receptor se internaliza en vesículas revestidas de clatrina, que se desprenden de sus revestimientos y se fusionan con endosomas tempranos. Con el pH ácido de los endosomas tempranos, la LDL se disocia de su receptor, y los materiales endocitados se clasifican para su degradación en los lisosomas o su reciclaje a la membrana plasmática. Las vesículas transportadoras que portan hidrolasas lisosómicas desde el aparato de Golgi se fusionan con los endosomas tardíos, que maduran a lisosomas donde la LDL se degrada y se libera el colesterol. Por otro lado, el receptor de LDL se recicla desde los endosomas tempranos a la membrana plasmática.



mas de separación) desde el cual las moléculas absorbidas por endocitosis son o bien recicladas a la membrana plasmática o bien permanecen en los endosomas tempranos conforme maduran para transformarse en endosomas tardíos y lisosomas, para ser degradadas. Además, los endosomas tempranos de las células polarizadas pueden transferir las proteínas endocitadas a diferentes dominios de la membrana plasmática —por ejemplo, entre los dominios apical y basolateral de las células epiteliales.

Una característica importante de los endosomas tempranos es que mantienen un pH interno ácido (entre 6,0 y 6,2) como resultado de la acción de una bomba de H^+ en la membrana. Este pH ácido provoca que muchos ligandos se disocien de sus receptores en el endosoma temprano. Tras este desacoplamiento, los receptores y sus ligandos pueden transportarse a destinos intracelulares diferentes. Un ejemplo clásico lo proporciona la LDL, que se disocia de su receptor en los endosomas tempranos (Fig. 13.44). El receptor entonces retorna a la membrana plasmática mediante vesículas de transporte que surgen a partir de extensiones tubulares de los endosomas. Por otro lado, el LDL se mantiene junto a otros componentes solubles del endosoma y posteriormente es transportado a un lisosoma, donde su degradación libera al colesterol.

Reciclarse a la membrana plasmática es el destino principal de las proteínas de membrana captadas por endocitosis mediada por receptor, y muchos

receptores (como el receptor de LDL) se devuelven a la membrana plasmática tras disociarse de sus ligandos en los endosomas tempranos. El reciclaje de estos receptores supone la continua internalización de sus ligandos. Por ejemplo, cada receptor de LDL realiza un ciclo de ida y vuelta desde la membrana plasmática a los endosomas aproximadamente cada 10 minutos. La importancia de la ruta de reciclaje se muestra por la magnitud del tráfico de la membrana que resulta de la endocitosis. Como ya hemos reseñado, aproximadamente el 50% de la membrana plasmática se internaliza cada hora por endocitosis mediada por receptor, por lo que debe ser reemplazada a una velocidad equivalente. Este reemplazamiento se debe, en su mayor parte, al reciclaje del receptor; cada hora solamente se sintetiza *de novo* un 5% de la superficie celular.

Los ligandos y las proteínas de membrana destinados a degradarse en los lisosomas se mantienen en los endosomas tempranos mientras maduran para transformarse en endosomas tardíos, que se localizan en las proximidades del compartimento nuclear (véase Fig. 13.44). El proceso de maduración de un endosoma temprano en otro tardío se acompaña de cambios de la composición lipídica de la membrana endosómica ante la futura fusión con vesículas de la red *trans* del Golgi. Los endosomas tardíos presentan un pH más bajo que los endosomas (pH de 5,5 a 6,0) y, como se ha comentado en el Capítulo 10, pueden fusionarse con vesículas transportadoras que portan hidrolasas lisosómicas desde el aparato de Golgi. Los endosomas tardíos se convierten en lisosomas al adquirir el complemento completo de enzimas lisosómicas y su pH se hace aún más ácido (alrededor de 5). Los materiales endocitados se degradan por acción de las hidrolasas ácidas en el interior de los lisosomas.

Aunque muchos receptores (como el receptor de LDL) se reciclan a la membrana plasmática, otros siguen destinos diferentes. Algunos son transportados a los lisosomas y degradados junto con sus ligandos. Por ejemplo, los receptores superficiales celulares de varios factores de crecimiento (descritos en el Cap. 15), se introducen tras la unión del factor de crecimiento y terminan siendo degradados en los lisosomas. El resultado de este proceso es la eliminación de los complejos receptor-ligando de la membrana plasmática, lo que implica el final de la respuesta de la célula a una estimulación por un factor de crecimiento —fenómeno conocido como **regulación por disminución del receptor** (***receptor down-regulation***).

Un tipo especializado de reciclaje desde los endosomas desempeña un papel importante en la transmisión de los impulsos nerviosos a través de las sinapsis (Fig. 13.45). Como se describió anteriormente en este capítulo, la llegada de un potencial de acción a la terminación de la mayoría de las neuronas es una señal para la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, liberándose los neurotransmisores que transmiten la señal a las células postsinápticas. Entonces, las vesículas sinápticas vacías se recuperan a partir de la membrana plasmática mediante vesículas recubiertas de clatrina, que se fusionan con los endosomas tempranos. Las vesículas sinápticas se regeneran directamente a partir de los endosomas. Acumulan un nuevo suministro de neurotransmisores y retornan a la membrana plasmática, quedando preparadas para el próximo ciclo de transmisión sináptica.

En las células polarizadas (p. ej., células epiteliales), los receptores internalizados también se pueden transferir a través de la célula al dominio opuesto de la membrana plasmática —un proceso llamado **transcitosis**—. Por ejemplo, un receptor endocitado desde el dominio basolateral de la membrana plasmática puede ser seleccionado en los endosomas tempranos para transportarse a la membrana apical. En algunas células éste es un mecanismo importante de clasificación de las proteínas de membrana (Fig. 13.46). En vez de ser clasificadas en la red *trans* Golgi, o endosomas de reciclaje (véase Fig.

Figura 13.45 Reciclaje de vesículas sinápticas.

RESUMEN

ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Bicapa fosfolipídica: La estructura fundamental de la membrana plasmática es una bicapa fosfolipídica, que también contiene glicolípidos y colesterol.

Proteínas de membrana: Las proteínas asociadas a la membrana son las responsables de llevar a cabo las funciones específicas de la membrana. La membrana se caracteriza como un mosaico fluido en el que las proteínas se insertan en la bicapa fosfolipídica.

Movilidad de las proteínas de membrana: Las proteínas son libres de difundirse lateralmente a través de la bicapa fosfolipídica. Sin embargo, la movilidad de algunas proteínas se restringe por sus asociaciones con otras moléculas. Además, las uniones estrechas impiden que las proteínas se muevan entre los distintos dominios de la membrana plasmática de las células epiteliales.

Glicocálix: La superficie celular está recubierta por una capa de carbohidratos denominada el glicocálix. Los carbohidratos de la superficie celular sirven de marcadores para el reconocimiento intercelular.

TRANSPORTE DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS

Difusión pasiva: Las moléculas hidrofóbicas pequeñas son capaces de cruzar la membrana plasmática difundiendo a través de la bicapa fosfolipídica.

Difusión facilitada y proteínas transportadoras: El tránsito de la mayoría de las moléculas biológicas viene mediado por proteínas transportadoras o de canal que permiten a las moléculas polares y cargadas atravesar la membrana plasmática sin interaccionar con su interior hidrofóbico.

Canales iónicos: Los canales iónicos median el tránsito rápido de iones seleccionados a través de la membrana plasmática. Están especialmente bien caracterizados en las células nerviosas y musculares, donde son los responsables de la transmisión de señales eléctricas.

Transporte activo dirigido por hidrólisis de ATP: La energía derivada de la hidrólisis del ATP puede dirigir el transporte de moléculas en contra de su gradiente electroquímico.

Transporte activo dirigido por gradientes iónicos: Los gradientes iónicos se emplean frecuentemente como una fuente de energía para conducir el transporte activo de otras moléculas.

PALABRAS CLAVE

fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomielina, fosfatidilinositol, glicolípidos, colesterol, balsa lipídica

modelo de mosaico fluido, proteínas periféricas de membrana, proteínas integrales de membrana, *proteínas transmembrana*, porinas, puente de glicosilfosfatidilinositol (GPI)

***dominio apical, dominio* basolateral**

glicocálix, selectina

difusión pasiva

difusión facilitada, proteína transportadora, proteína de canal

acuaporina, canal iónico, canal regulado por ligando, canal regulado por voltaje, técnica de *patch-clamp*, ecuación de Nernst, potencial de acción

transporte activo, bomba iónica, bomba de Na^+ - K^+, ATPasa Na^+ - K^+, transportador ABC

simporte, uniporte, antiporte

PALABRAS CLAVE

endocitosis, fagocitosis, pinocitosis, fagosoma, fagolisosoma

endocitosis mediada por receptor, depresión revestida de clatrina, dinamina, vesícula revestida de clatrina, ligando, lipoproteína de baja densidad (LDL), endocitosis en fase fluida, caveolas, caveolina, macropinocitosis

endosoma, regulación a partir de los receptores, transcitosis

RESUMEN

ENDOCITOSIS

Fagocitosis: Las células ingieren partículas grandes, como bacterias y desechos celulares, por fagocitosis.

Endocitosis mediada por receptor: La forma mejor conocida de endocitosis es la endocitosis mediada por receptor, que proporciona un mecanismo para la entrada selectiva de macromoléculas específicas.

Tráfico de proteínas en la endocitosis: Las moléculas recogidas por endocitosis son transportadas a los endosomas, donde se clasifican para ser recicladas a la membrana plasmática o para ser degradadas en los lisosomas.

Preguntas

1. ¿Cómo se extiende el colesterol al rango de temperatura funcional de la bicapa lipídica?

2. ¿Cómo se diferencian las proteínas periféricas de membrana de las proteínas integrales de membrana?

3. ¿Cómo apoyaron los experimentos de fusión celular de Frye y Edidin el modelo del mosaico fluido para la estructura de la membrana? ¿Qué resultados hubieran obtenido si hubiesen incubado células fusionadas a 2 °C?

4. ¿Qué son las balsas lipídicas y en qué procesos celulares están implicadas?

5. ¿Cuáles son dos de las principales funciones del glicocálix?

6. La concentración de K^+ es casi 20 veces superior en el interior de los axones de calamar que en los fluidos extracelulares, generando un potencial de equilibrio de membrana de –75 mV. ¿Cuál sería el potencial de equilibrio de membrana esperado si la concentración de K^+ fuera solamente 10 veces mayor dentro que fuera de la célula? ¿Por qué el potencial de reposo habitual de la membrana (–60 mV) es diferente del potencial de equilibrio del K^+, de –75 mV? (Dado que: $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal/mol/deg, $T = 298$ K, $\ln(x) = 2{,}3 \log_{10}(x)$, $F = 23$ kcal/V/mol)

7. El curare se une a los receptores nicotínicos de la acetilcolina y previene su apertura. ¿Cómo afectaría a la contracción muscular?

8. ¿Cómo detecta el filtro de selectividad de los canales de K^+ la diferencia entre iones K^+ y Na^+?

9. ¿Cómo puede transportarse la glucosa en contra de su gradiente de concentración sin el gasto directo de ATP en células epiteliales intestinales?

10. ¿Cómo confiere el gen *mdr* resistencia a medicamentos a las células cancerosas?

11. ¿Cómo determinaron Brown y Goldstein que el LDL se une a un número limitado de sitios de unión específicos en la superficie de células normales?

12. ¿Qué información hemos obtenido a partir de estudios sobre células de niños con hipercolesterolemia familiar sobre los mecanismos de endocitosis mediada por receptores?

Bibliografía

Estructura de la membrana plasmática

Allen, J. A., R. A. Halverson-Tamboli and M. M. Rasenick. 2007. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Rev. Neurosci.* 8: 128–140. [R]

Branton, D., C. M. Cohen and J. Tyler. 1981. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell* 24: 24–32. [P]

Diesenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel. 1985. The structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis* at 3-Å resolution. *Nature* 318: 618–624. [P]

Di Paolo, G. and P. De Camilli. 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443: 651–657. [R]

Engelman, D. M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438: 578–580. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62:121–138. [R]

Gaus, K., E. Gratton, E. P. Kable, A. S. Jones, L. Gelissen, L. Kritharides and W. Jessup. 2003. Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 15554–15559. [P]

Jacobson, K., O. G. Mouritsen and R. G. Anderson. 2007. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nature Cell Biol.* 9: 7–14. [R]

Jay, D. G. 1996. Role of band 3 in homeostasis and cell shape. *Cell* 86: 853–854. [R]

Lasky, L. A. 1995. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 113–139. [R]

Michell, R. H. 2008. Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 151–161. [R]

Montell, C., L. Birnbaumer and V. Flockerzi. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108: 595–598. [R]

Mukherjee, S. and F. R. Maxfield. 2004. Membrane domains. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 839–866. [R]

Rees, D. C., H. Komiya, T. O. Yeates, J. P. Allen and G. Feher. 1989. The bacterial photosynthetic reaction center as a model for membrane proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 607–633. [R]

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247–296. [R]

Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720–731. [P]

Tamm, L. K., A. Arora and J. H. Kleinschmidt. 2001. Structure and assembly of β-barrel membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 32399–32402. [R]

van Meer, G., D. R. Voelker and G. W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 112–124. [R]

Yu, J., D. A. Fischman and T. L. Steck. 1973. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Struct.* 1: 233–248. [P]

Zhang, F. L. and P. J. Casey. 1996. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 241–269. [R]

Transporte de moléculas pequeñas

Bell, G. I., C. F. Burant, J. Takeda and G. W. Gould. 1993. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J. Biol. Chem.* 268: 19161–19164. [R]

Borgnia, M., S. Nielsen, A. Engel and P. Agre. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 425–458. [R]

Borst, P. and A. H. Schinkel. 1997. Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends Genet.* 13: 217–222. [R]

Changeux, J. P. and A. Taly. 2008. Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine. *Trends Mol. Med.* 14: 93–102. [R]

Gadsby, D. C. 2007. Structural biology: ion pumps made crystal clear. *Nature* 450: 957–959. [R]

Garcia, M. L. 2004. Ion channels: Gate expectations. *Nature* 430: 153–155. [R]

Gottesman, M. M. and I. M. Pastan. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 385–427. [R]

Hedfalk, K., S. Tornroth-Horsefield, M. Nyblom, U. Johanson, P. Kjellbom and R. Neutze. 2006. Aquaporin gating. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 447–456.

Hille, B. 2001. *Ionic Channels of Excitable Membranes.* 3rd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.

Hollenstein, K., D. C. Frei and K. P. Locher. 2007. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* 446: 213–216. [P]

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500–544. [P]

Jongsma, H. J. and R. Wilders. 2001. Channelopathies: Kir2.1 mutations jeopardize many cell functions. *Curr. Biol.* 11: R747–R750. [R]

Kaplan, J. H. 2002. Biochemistry of Na, K-ATPase. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 511–535. [R]

Lester, H. A., M. I. Dibas, D. S. Dahan, J. F. Leite and D. A. Dougherty. 2004. Cys-loop receptors: New twists and turns. *Trends Neurosci.* 27: 329–336. [R]

Locher, K. P. 2004. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 426–431. [R]

MacLennan, D. H., W. J. Rice and N. M. Green. 1997. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPases. *J. Biol. Chem.* 272: 28815–28818. [R]

Maurel, C. 2007. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Lett.* 581: 2227–2236. [R]

Morth, J. P., B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen, T. L. Sorensen, J. Petersen, J. P. Andersen, B. Vilsen and P. Nissen. 2007. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450: 1043–1049. [P]

Neher, E. and B. Sakmann. 1992. The patch clamp technique. *Sci. Am.* 266(3): 44–51. [R]

Olesen, C., M. Picard, A. M. Winther, C. Gyrup, J. P. Morth, C. Oxvig, J. V. Moller and P. Nissen. 2007. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* 450: 1036–1042. [P]

Pedersen, B. P., M. J. Buch-Pedersen, J. P. Morth, M. G. Palmgren and P. Nissen. 2007. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450: 1111–1114. [P]

Riordan, J. R. 1993. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Ann. Rev. Physiol.* 55: 609–630. [R]

Sakmann, B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Science* 256: 503–512. [R]

Sigworth, F. J. 2003. Structural biology: Life's transistors. *Nature* 423: 21–22. [R]

Swartz, K. J. 2004. Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nature Rev. Neurosci.* 5: 905–916. [R]

Toyoshima, C. and G. Inesi. 2004. Structural basis of ion pumping by Ca^{2+}-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 269–292. [R]

Welsh, M. J. and A. E. Smith. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73: 1251–1254. [R]

Endocitosis

Brown, M. S. and J. L. Goldstein. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34–47. [R]

Conner, S. D. and S. L. Schmid. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37–44. [R]

Gruenberg, J. and H. Stenmark. 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 317–323. [R]

Liu, P., M. Rudick and R. G. Anderson. 2002. Multiple functions of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 277: 41295–41298. [R]

Mayor, S. and R. E. Pagano. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 603–612. [R]

Mostov, K., T. Su and M. ter Beest. 2003. Polarized epithelial membrane traffic: Conservation and plasticity. *Nature Cell Biol.* 5: 287–293. [R]

Nelson, W. J. 1992. Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science* 258: 948–955. [R]

Orth, J. D. and M.A. McNiven. 2003. Dynamin at the actin-membrane interface. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1: 31–39. [R]

Parton, R. G. and K. Simons. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 185–194. [R]

Pelkmans, L., T. Burli, M. Zerial and A. Helenius. 2004. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118: 767–780. [R]

Sudhof, T. C. 1995. The synaptic vesicle cycle: A cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645–653. [R]

Takei, K. and V. Haucke. 2001. Clathrin-mediated endocytosis: Membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol.* 11: 385–391. [R]

CAPÍTULO 14

Paredes celulares, matriz extracelular e interacciones celulares

AUNQUE LOS LÍMITES CELULARES ESTÁN DEFINIDOS POR LA MEMBRANA PLASMÁTICA, muchas células están rodeadas por un conjunto insoluble de macromoléculas secretadas. Las células de bacterias, hongos, algas y plantas superiores están rodeadas de paredes celulares rígidas, que son una parte integrante de la célula. A pesar de que las células animales no estén rodeadas por paredes celulares, la mayoría de las células de los tejidos animales están embebidas en una matriz extracelular que consiste en proteínas y polisacáridos secretados. La matriz extracelular no sólo proporciona soporte estructural para las células y tejidos, sino que además juega papeles importantes en la regulación del comportamiento celular. Las interacciones de las células con la matriz extracelular anclan el citoesqueleto y regulan la forma y el movimiento celular. Asimismo, las interacciones directas entre células son claves para la organización de las células en los tejidos tanto vegetales como animales, además de proporcionar canales a través de los cuales las células pueden comunicarse con sus vecinos.

Paredes celulares

Las rígidas paredes celulares que rodean a las bacterias y muchos tipos de células eucariotas (hongos, algas y plantas superiores) determinan la forma celular y previenen que las células se hinchen y estallen como resultado de la presión osmótica. A pesar de sus funciones comunes, las paredes celulares de las bacterias y eucariotas son estructuralmente muy diferentes. Las paredes celulares bacterianas consisten en polisacáridos unidos mediante enlaces cruzados con pequeños polipéptidos, que forman una coraza covalente en torno a la célula completa. Por el contrario, las paredes celulares de los eucariotas están compuestas principalmente de polisacáridos incluidos en una matriz semejante a un gel. En lugar de ser estructuras fijas, las paredes celulares vegetales pueden ser modificadas tanto durante el desarrollo de la planta como en respuesta a señales del ambiente, de modo que las paredes celulares de las plantas juegan papeles críticos en la determinación de la organización de tejidos vegetales en la estructura de la planta completa.

Paredes celulares bacterianas

Las rígidas paredes celulares bacterianas determinan las formas características de los diferentes tipos de células bacterianas. Por ejemplo, algunas bac-

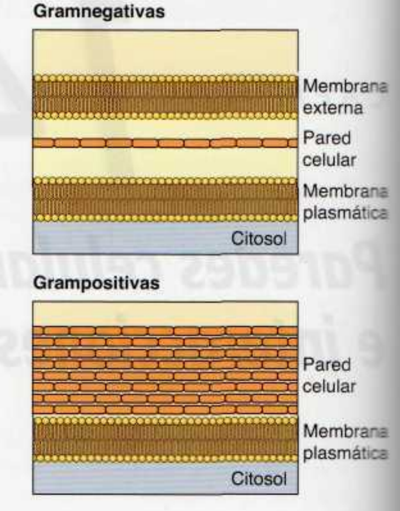


Figura 14.1 Paredes celulares bacterianas. La membrana plasmática de las bacterias gramnegativas está rodeada por una pared celular delgada por debajo de la membrana externa. Las bacterias grampositivas carecen de la membrana externa y tienen una pared celular gruesa.

terias (como *E. coli*) tienen forma de bacilo, mientras que otras son esféricas (p. ej., *Pneumococcus* y *Staphylococcus*) o con forma de espiral (p. ej., la espiroqueta *Treponema pallidum*, causante de la sífilis). Adicionalmente, la estructura de sus paredes celulares divide a las bacterias en dos amplios grupos que pueden distinguirse por un método de tinción conocida como la tinción Gram, desarrollada por Christian Gram en 1884 (Fig. 14.1). Las bacterias gramnegativas (como *E. coli*) poseen una membrana doble que se describe en el Capítulo 13, en el que la membrana plasmática está rodeada por una membrana externa permeable (véase Fig. 13.10). Estas bacterias tienen una pared celular delgada localizada entre sus membranas interna y externa. Por el contrario, las bacterias grampositivas (como el patógeno humano común *Staphylococcus aureus*) presentan solamente una única membrana plasmática, que está rodeada de una pared celular mucho más gruesa.

■ La membrana externa de las bacterias gramnegativas contiene un lipopolisacárido (LPS) conocido como endotoxina. La liberación de LPS al torrente sanguíneo desencadena fiebre, descenso de la tensión sanguínea e inflamación.

A pesar de estas diferencias estructurales, el principal componente de las paredes celulares tanto de las bacterias gramnegativas como grampositivas es el **peptidoglicano** (Fig. 14.2) que está constituido por cadenas lineales de polisacáridos, entrelazadas por péptidos cortos. Debido a su estructura entrelazada, el peptidoglicano forma una cubierta covalente fuerte alrededor de toda la célula bacteriana. Es interesante destacar que lo que les hace a las bacterias vulnerables frente a algunos antibióticos es la estructura característica de sus paredes celulares. La penicilina, por ejemplo, inhibe la enzima responsable de formar los puentes de unión cruzados entre las diferentes hebras de peptidoglicano, interfiriendo de esta manera en la síntesis de la pared celular y bloqueando el crecimiento bacteriano.

Paredes celulares eucariotas

A diferencia de las de las bacterias, las paredes celulares de los eucariotas (incluyendo hongos, algas y plantas superiores) se componen principalmente de polisacáridos (Fig. 14.3). El polisacárido estructural fundamental de las paredes celulares de los hongos es la **quitina**, que también forma las conchas de los cangrejos y los exoesqueletos de insectos y de otros artrópodos. La quitina es un polímero lineal de residuos de *N*-acetilglucosamina. Las paredes celulares de la mayoría de las algas y de las plantas superiores se componen principalmente de **celulosa**, que es el polímero más abundante de la tierra. La celulosa es un polímero lineal de restos de glucosa que suele estar constituido por más de 10.000 monómeros de glucosa. Los restos

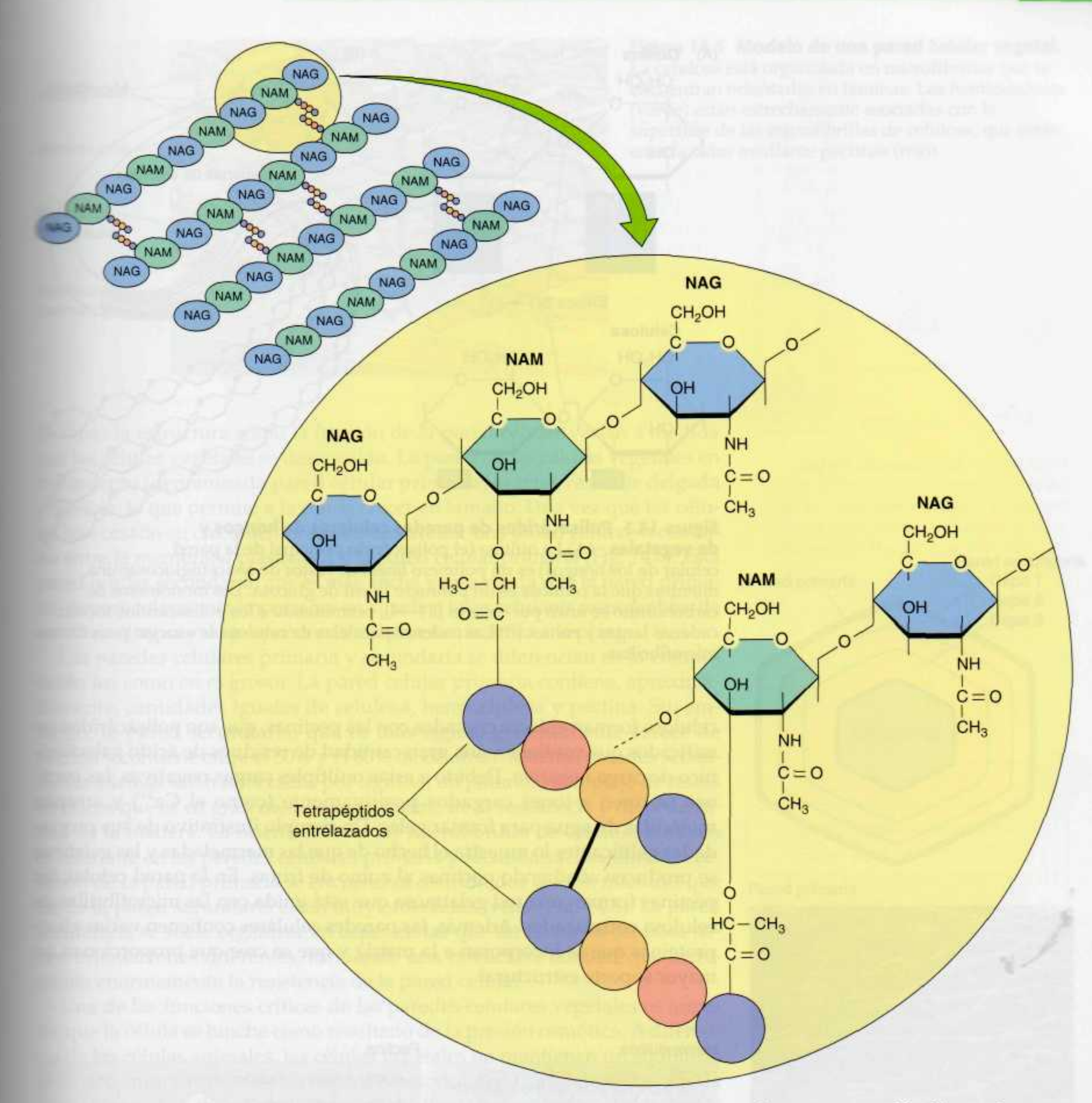


Figura 14.2 **Peptidoglicano de *E. coli*.** Las cadenas de polisacáridos están constituidas por restos de *N*-acetilglucosamina (NAG) y ácido *N*-acetilmurámico (NAM) alternantes, unidos por enlaces glicosídicos β(1 → 4). Las cadenas paralelas se entrelazan por tetrapéptidos unidos a los restos de NAM. Los aminoácidos que forman los tetrapéptidos varían en las distintas especies bacterianas.

de glucosa se unen por enlaces β(1 → 4), lo que permite al polisacárido formar largas cadenas rectas. Después de su transporte a través de la membrana plasmática al espacio extracelular, las 36 cadenas polisacarídicas sencillas se asocian entre sí en paralelo para formar microfibrillas de 3 nm. Las microfibrillas de celulosa se pueden extender a lo largo de varios micrómetros.

En el interior de la pared celular, las microfibrillas de celulosa están embebidas en una matriz compuesta por proteínas y otros dos tipos de polisacáridos: **hemicelulosas** y **pectinas** (Fig. 14.4). Las hemicelulosas son polisacáridos altamente ramificados que están unidos a la superficie de las microfibrillas de celulosa por enlaces de hidrógeno (Fig. 14.5). Esto estabiliza las microfibrillas de celulosa para formar una fibra fuerte, responsable de la fuerza mecánica de las paredes celulares vegetales. Las microfibrillas de

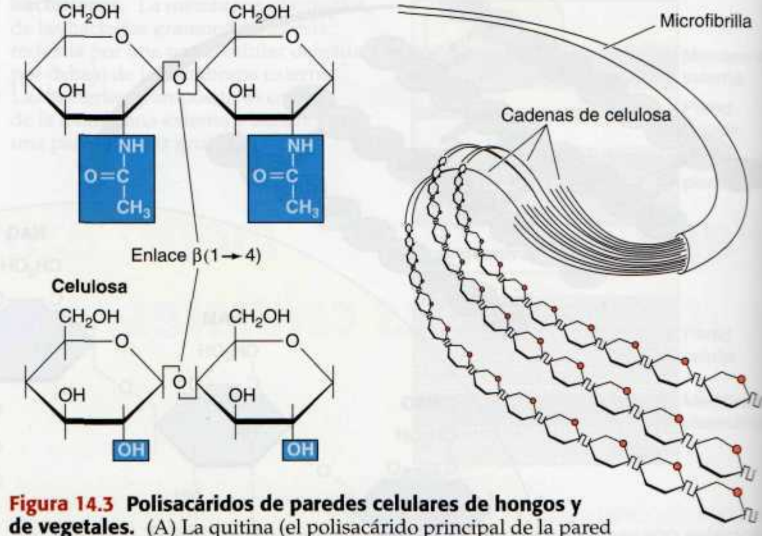


Figura 14.3 Polisacáridos de paredes celulares de hongos y de vegetales. (A) La quitina (el polisacárido principal de la pared celular de los hongos) es un polímero lineal de restos de *N*-acetilglucosamina, mientras que la celulosa es un polímero lineal de glucosa. Los monómeros de carbohidrato se unen por enlaces β(1→4), permitiendo a los polisacáridos formar cadenas largas y rectas. *(B) Las cadenas paralelas de celulosa se asocian para formar* microfibrillas.

celulosa forman enlaces cruzados con las pectinas, que son polisacáridos ramificados que contienen una gran cantidad de residuos de ácido galacturónico de carga negativa. Debido a estas múltiples cargas negativas, las pectinas se unen a iones cargados positivamente (como el Ca^{2+}) y atrapan moléculas de agua para formar geles. Un ejemplo ilustrativo de sus propiedades gelificantes lo muestra el hecho de que las mermeladas y las gelatinas se producen añadiendo pectinas al zumo de frutas. En la pared celular, las pectinas forman una red gelatinosa que está unida con las microfibrillas de celulosa entrelazadas. Además, las paredes celulares contienen varias glicoproteínas que se incorporan a la matriz y que se cree que proporcionan un mayor soporte estructural.

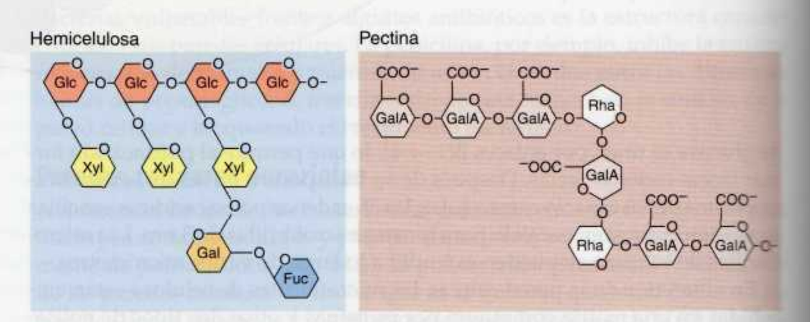


Figura 14.4 Estructuras de una hemicelulosa y de una pectina. Una hemicelulosa (xiloglucano) representativa consiste en una rama de residuos de glucosa (Glc) con cadenas laterales de xilosa (Xyl), galactosa (Gal) y mucosa (Fuc). La rama de ramnogalacturonano (una pectina representativa) contiene residuos de ácido glucurónico (GalA) y ramnosa (Rha) a los que también se unen numerosas cadenas laterales.

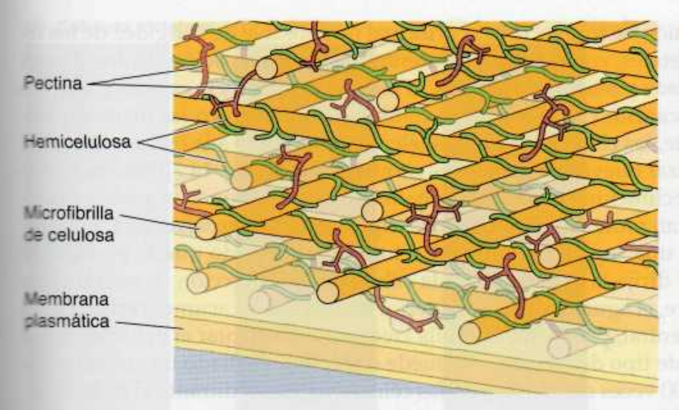
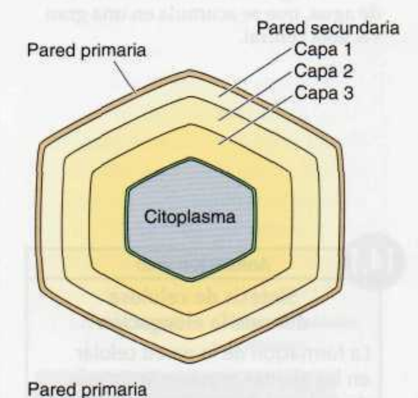


Figura 14.5 Modelo de una pared celular vegetal. La celulosa está organizada en microfibrillas que se encuentran orientadas en láminas. Las hemicelulosas (verde) están estrechamente asociadas con la superficie de las microfibrillas de celulosa, que están entrelazadas mediante pectinas (rojo).

Tanto la estructura como la función de la pared celular varían a medida que las células vegetales se desarrollan. La pared de las células vegetales en crecimiento (denominada **pared celular primaria**) es relativamente delgada y flexible, lo que permite a la célula crecer en tamaño. Una vez que las células han cesado su crecimiento, suelen desarrollar una **pared celular secundaria** entre la membrana plasmática y la pared celular primaria (Fig. 14.6). Esta pared celular secundaria, que es más ancha y más rígida que la pared primaria, es particularmente importante en aquellos tipos celulares responsables de conducir el agua y de proporcionar resistencia mecánica a la planta.

Las paredes celulares primaria y secundaria se diferencian en la composición así como en el grosor. La pared celular primaria contiene, aproximadamente, cantidades iguales de celulosa, hemicelulosa y pectina. Sin embargo, la pared secundaria, que es más rígida, generalmente carece de pectina y contiene entre el 50% y el 80% de celulosa. Muchas paredes secundarias además están reforzadas por **lignina**, un polímero complejo de restos fenólicos que es en gran medida responsable de la resistencia y de la densidad de la madera. La orientación de las microfibrillas de celulosa también es diferente en las paredes celulares primaria y secundaria. Las fibras de celulosa de la pared primaria se encuentran distribuidas al azar, mientras que las de la pared secundaria están muy ordenadas (véase Fig. 14.6). La pared secundaria se suele organizar en capas en las que las fibras de celulosa tienen orientaciones diferentes, formando una estructura laminar que incrementa enormemente la resistencia de la pared celular.

Una de las funciones críticas de las paredes celulares vegetales es impedir que la célula se hinche como resultado de la presión osmótica. A diferencia de las células animales, las células vegetales no mantienen un equilibrio osmótico entre su citosol y los fluidos extracelulares. Como consecuencia, la presión osmótica dirige continuamente el flujo de agua hacia el interior de la célula. Las células vegetales toleran este flujo de agua hacia el interior debido a que sus paredes celulares rígidas impiden que la célula se hinche y estalle. En su lugar, se genera una presión hidrostática interna (llamada **presión de turgencia**), que acaba por igualar a la presión osmótica e impide que el agua siga entrando.



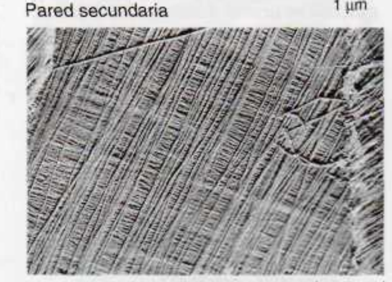


Figura 14.6 Paredes celulares primaria y secundaria. La pared celular secundaria se dispone entre la pared celular primaria y la membrana plasmática. La pared secundaria suele estar constituida por tres capas, que difieren en la orientación de sus microfibrillas de celulosa. Las micrografías electrónicas muestran las microfibrillas de celulosa en la pared celular primaria y secundaria. (Pared primaria, cortesía de F. C. Steward; pared secundaria, Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.)

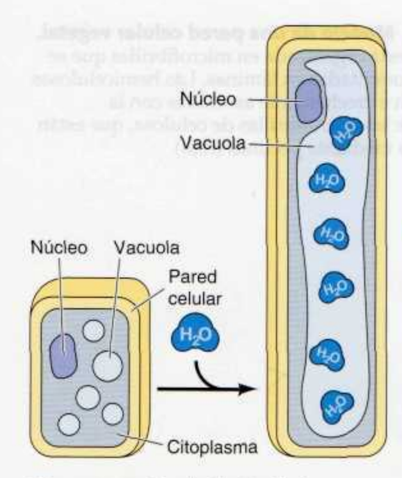


Figura 14.7 Crecimiento de las células vegetales. La presión de turgencia dirige la expansión de las células vegetales mediante la entrada de agua, que se acumula en una gran vacuola central.

La presión de turgencia es la principal responsable de la rigidez de los tejidos vegetales, como resulta aparente tras la observación de una planta deshidratada y marchita. Además, la presión de turgencia es el fundamento de un mecanismo de crecimiento celular que es único en las plantas. Concretamente, las células vegetales suelen crecer debido a la entrada de agua, sin sintetizar nuevos componentes citoplasmáticos (Fig. 14.7). Este mecanismo de crecimiento celular está señalizado por hormonas vegetales (**auxinas**) activan proteínas denominadas expansinas. Las expansinas actúan debilitando una región de la pared celular, permitiendo que la presión de turgencia dirija la expansión de la célula en esa dirección. A medida que esto ocurre, el agua que fluye al interior de la célula se acumula en una gran vacuola central, por lo que la célula crece sin incrementar el volumen de su citosol. Este tipo de crecimiento puede dar como resultado un aumento entre 10 y 100 veces del tamaño de las células vegetales durante el desarrollo.

A medida que las células crecen, se van depositando nuevos componentes de la pared celular por fuera de la membrana plasmática. Los componentes de la matriz, incluyendo hemicelulosas y pectinas, se sintetizan en el aparato de Golgi y son secretados. La celulosa, sin embargo, es sintetizada por un complejo enzimático de la membrana plasmática **celulosa sintasa** (Fig. 14.8). La celulosa sintasa es una enzima transmembrana que sintetiza celulosa a partir de UDP-glucosa en el citosol. La cadena de celulosa en crecimiento permanece unida a la enzima a medida que es sintetizada y translocada a través de la membrana plasmática al exterior de la célula a través de un poro creado por múltiples subunidades enzimáticas. Se emplea un mecanismo similar para sintetizar quitina y ácido hialurónico, un componente de la matriz extracelular analizado más adelante en este capítulo.

En las células en expansión, las microfibrillas de celulosa recién sintetizadas son depositadas formando un ángulo recto con respecto a la dirección de elongación celular —una orientación que se cree que juega un papel importante en la determinación de la dirección de expansión celular (véase Fig. 14.8)—. Es interesante señalar que las microfibrillas de celulosa en las paredes celu-

14.1 Animación web

Síntesis de celulosa durante la elongación

La formación de la pared celular en las plantas requiere la síntesis de cadenas de celulosa por parte de complejos enzimáticos localizados en la membrana plasmática.

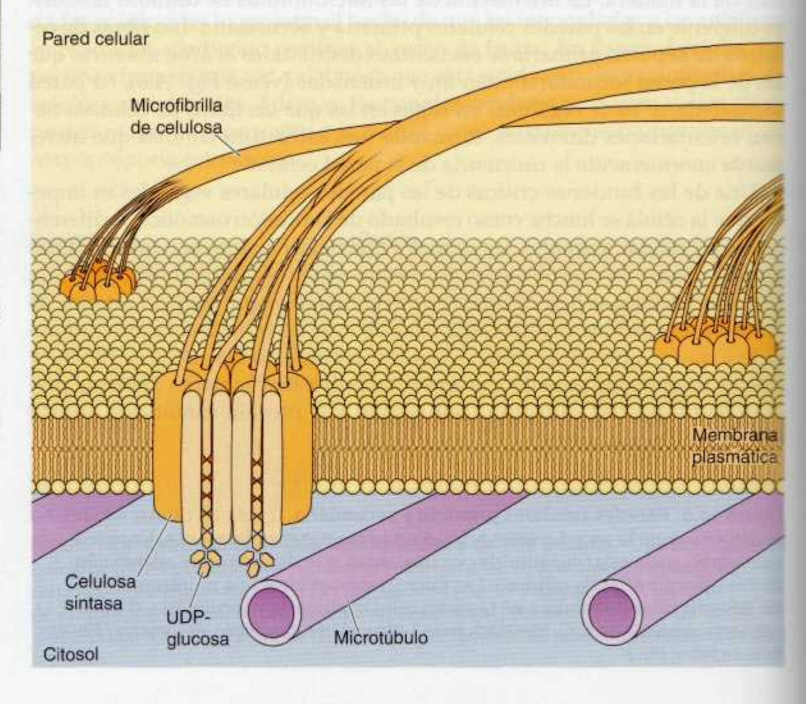


Figura 14.8 Síntesis de celulosa durante la elongación celular. Las celulosa sintasas son enzimas transmembrana que sintetizan celulosa a partir de UDP-glucosa. La UDP-glucosa se une al dominio catalítico de la celulosa sintasa en el citosol, y la cadena de celulosa en crecimiento es translocada al exterior de la célula a través de un poro creado en la membrana plasmática por dos subunidades de la enzima. Complejos de ocho a diez dímeros de celulosa sintasa dirigen a los microtúbulos por debajo de la membrana plasmática para que las nuevas microfibrillas de celulosa se dispongan en ángulo recto a la dirección de elongación de la célula.

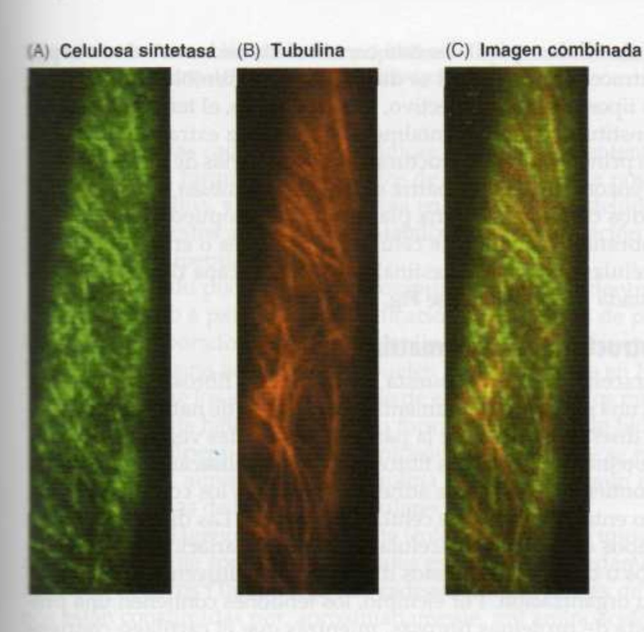


Figura 14.9 Movimiento de la celulosa sintetasa a lo largo de los microtúbulos. En la imagen se puede visualizar la asociación de la celulosa sintetasa (fluorescencia verde) con los microtúbulos (fluorescencia roja) en células de brotes de *Arabidopsis*. Las imágenes tomadas con un intervalo de 20 segundos revelan el movimiento del complejo a lo largo de los microtúbulos. En la imagen mixta se combinan las imágenes de la celulosa sintetasa y los microtúbulos para mostrar su co-localización. (Tomado Paredez, A., A. Wright y D. W. Ehrhardt. 2006. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 574.)

lares en expansión están dispuestas paralelamente a los microtúbulos corticales que subyacen la membrana plasmática. Estos microtúbulos determinan la orientación de las microfibrillas de celulosa recién sintetizadas al orientar el movimiento de los complejos de la celulosa sintetasa en la membrana (Fig. 14.9). Los microtúbulos corticales definen así la dirección del crecimiento de la pared celular, lo cual a su vez determina la dirección de la expansión celular y finalmente la forma de toda la planta.

Las paredes celulares de diferentes tejidos vegetales, como las hojas, tallos, raíces y flores, están formadas principalmente por celulosa, pero difieren en sus componentes de matriz y en la organización de las fibrillas de celulosa. Las especies vegetales expresan de nueve a 18 enzimas celulosa sintetasa diferentes y cada complejo de ellas contiene, al menos, tres formas distintas, lo que hace posible la en organización diferente de las paredes celulares en los diversos tejidos.

Matriz extracelular e interacciones célula-matriz

Aunque las células animales no están rodeadas por paredes celulares, muchas de las células en los tejidos de los organismos pluricelulares se encuentran embebidas en una **matriz extracelular** constituida por proteínas secretadas y polisacáridos. La matriz extracelular rellena los espacios entre las células y une entre sí las células y los tejidos. Un tipo de matriz extracelular es la **lámina basal**, previamente denominada membrana basal, sobre la que descansan las células epiteliales (Fig. 14.10). Además de sostener láminas de células epiteliales, la lámina basal rodea a las células musculares, células adiposas y nervios periféricos. La matriz extracelular, sin embargo, es más abundante en los tejidos conectivos. Por ejemplo, el tejido conectivo laxo

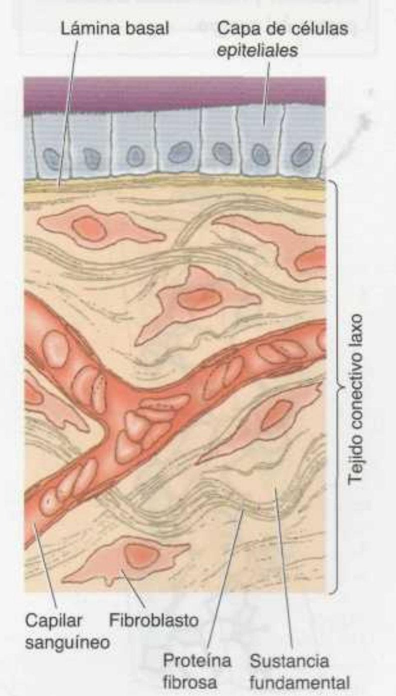


Figura 14.10 Ejemplos de matriz extracelular. Las láminas de células epiteliales descansan sobre una capa delgada de matriz extracelular llamada lámina basal. Bajo la lámina basal está el tejido conectivo laxo, que consiste fundamentalmente en matriz extracelular secretada por los fibroblastos. La matriz extracelular contiene proteínas fibrosas estructurales embebidas en una sustancia fundamental gelatinosa, de naturaleza polisacarídica.

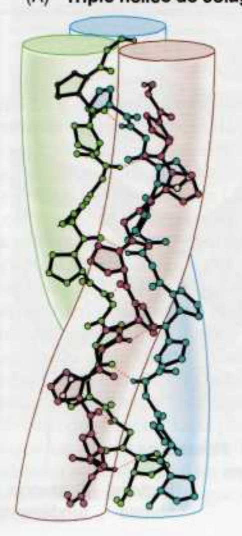
bajo las capas de células epiteliales está constituido fundamentalmente por una matriz extracelular en la cual se distribuyen los fibroblastos. De igual manera, otros tipos de tejido conectivo, como el hueso, el tendón y el cartílago, están constituidos fundamentalmente por matriz extracelular, que es la responsable principal de su estructura y función. Varias de las proteínas y polisacáridos encontrados en la matriz extracelular también están estrechamente asociados con la membrana plasmática. Éstos pueden observarse sobre la membrana plasmática de células endoteliales o en la membrana apical de las células epiteliales intestinales, como una capa rica en polisacáridos denominada glicocáliz (véase Fig. 13.14).

Proteínas estructurales de la matriz

La matriz extracelular está compuesta por proteínas fibrosas, resistentes, embebidas en una sustancia fundamental gelatinosa y de naturaleza polisacarídica —un diseño similar al de la pared de las células vegetales—. Además de las proteínas estructurales fibrosas y de los polisacáridos, la matriz extracelular contiene proteínas de adhesión que unen los componentes de la matriz tanto entre sí como a las células adyacentes. Las diferencias entre los distintos tipos de matriz extracelular se deben a variaciones cuantitativas en los tipos o cantidades de estos diferentes constituyentes y a modificaciones en su organización. Por ejemplo, los tendones contienen una proporción elevada de proteínas fibrosas, mientras que el cartílago contiene una alta concentración de polisacáridos que forman un gel firme, resistente a la compresión. En el hueso, la matriz extracelular está endurecida por el depósito de cristales de fosfato cálcico. La estructura laminar de la lámina basal también se debe a unos componentes de la matriz que difieren de aquellos que se encuentran en otros tejidos conjuntivos.

La proteína estructural principal de la matriz extracelular es el **colágeno**, que es la proteína más abundante en los tejidos animales. Los colágenos son una gran familia de proteínas, constituida al menos por 27 miembros diferentes. Se caracterizan por formar hélices triples en las que tres cadenas polipeptídicas se enrollan estrechamente una alrededor de la otra en una estructura en forma de cuerda (Fig. 14.11). Los diferentes polipéptidos del colágeno se pueden ensamblar en 42 trímeros diferentes. Los dominios de triple hélice de los colágenos consisten en repeticiones de la secuencia de aminoácidos Gly-X-Y. Se requiere una glicina (el aminoácido más pequeño, con una cadena lateral constituida sólo por un hidrógeno) en cada tercera posi-

Las células cancerosas secretan proteasas que digieren proteínas de la matriz extracelular, permitiendo a las células cancerosas invadir los tejidos de alrededor y metastatizar a otras partes del cuerpo.



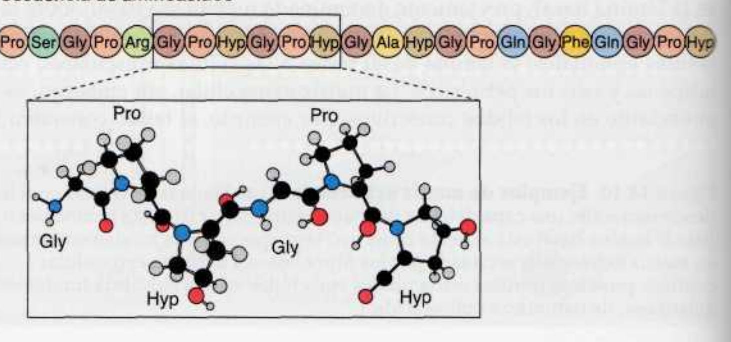


Figura 14.11 Estructura del colágeno. (A) Tres cadenas polipeptídicas se enrollan una alrededor de la otra en una estructura característica de triple hélice. (B) La secuencia de aminoácidos de un dominio de triple hélice de colágeno consiste en repeticiones de Gly-X-Y, en el que X suele ser prolina e Y suele ser hidroxiprolina (Hyp).

Figura 14.12 Formación de la hidroxiprolina. La prolina hidroxilasa convierte los restos de prolina del colágeno en hidroxiprolina.

ción para que las cadenas polipeptídicas estén lo suficientemente agrupadas como para formar la triple hélice de colágeno. En la posición X suele aparecer la prolina, y la hidroxiprolina en la posición Y; debido a su estructura en anillo, estos aminoácidos estabilizan la conformación helicoidal de las cadenas polipeptídicas.

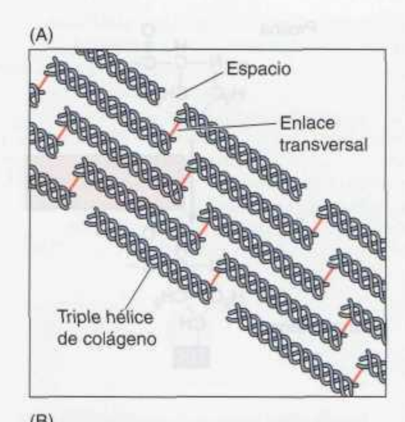
El aminoácido poco común hidroxiprolina se forma dentro del retículo endoplasmático a partir de la modificación de los restos de prolina que ya han sido incorporados a las cadenas polipeptídicas de colágeno (Fig. 14.12). Los restos de lisina en el colágeno suelen ser convertidos en hidroxilisinas. Se considera que los grupos hidroxilo de estos aminoácidos modificados estabilizan la triple hélice de colágeno formando enlaces de hidrógeno entre las cadenas polipeptídicas. Estos aminoácidos raramente se encuentran en otras proteínas, aunque la hidroxiprolina también es común en algunas de las glicoproteínas de las paredes celulares de las plantas.

El tipo de colágeno más abundante (colágeno tipo I) es uno de los colágenos fibrilares, que son los componentes estructurales fundamentales de los tejidos conectivos (Tabla 14.1). Las cadenas polipeptídicas de estos colágenos están constituidas por, aproximadamente, mil aminoácidos o 330 repeticiones de Gly-X-Y. Tras ser secretados de las células estos colágenos se ensamblan en **fibrillas de colágeno** en las que las moléculas de triple hélice se

La prolil hidroxilasa, la enzima que cataliza la modificación de residuos de prolina en hidroxiprolina en el colágeno requiere la vitamina C para su actividad. La deficiencia de vitamina C causa escorbuto, un trastorno caracterizado por lesiones de la piel y hemorragias de los vasos sanguíneos como resultado de un tejido conectivo debilitado.

Tabla 14.1 Miembros representativos de la familia del colágeno

Clases de colágeno	Tipos	Distribución de tejidos
Formador de fibrillas (fibrilares)	I	Mayoría de tejidos conectivos
	II	Cartílago y humor vítreo
	III	Tejidos conectivos extensibles (p. ej., piel y pulmón)
	V	Tejidos que contienen colágeno I
	XI	Cartílago
	XXIV	Hueso y córnea
	XXVII	Ojo, oído y pulmón
Asociado a fibrillas	IX	Cartílago
	XII	Tejidos que contienen colágeno I
	XIV	Tejidos que contienen colágeno I
	XVI	Múltiples tejidos
	XIX	Múltiples tejidos
	XX	Córnea
	XXI	Múltiples tejidos
	XXII	Uniones celulares
	XXVI	Testículo y ovario
Formador de redes	IV	Láminas basales
	VI	Láminas basales
	VIII	Múltiples tejidos
	X	Cartílago
	XVIII	Láminas basales
Filamentos de anclaje	VII	Zonas de unión de las láminas basales al tejido conectivo subyacente
Transmembrana	XIII	Numerosos tejidos
	XVII	Hemidesmosomas de la piel
	XXIII	Numerosos tejidos
	XXV	Células nerviosas



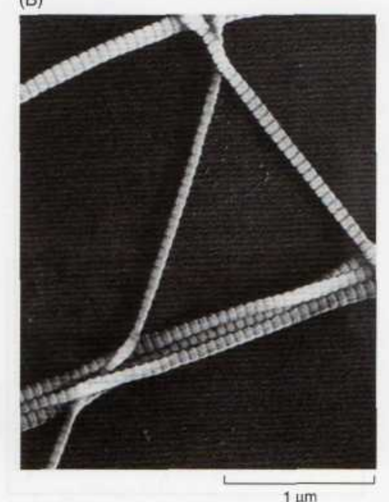


Figura 14.13 Fibrillas de colágeno. (A) Las moléculas de colágeno se ensamblan en una formación discontinua regular para constituir fibrillas. Las moléculas se superponen en una cuarta parte de su longitud, y hay un pequeño hueco entre el extremo N-terminal de una molécula y el extremo C-terminal de la siguiente. Esta estructura queda reforzada mediante enlaces covalentes transversales entre las cadenas laterales de los restos de lisina o de hidroxilisina, principalmente en los extremos de las moléculas. (B) Micrografía electrónica de fibrillas de colágeno. La disposición discontinua de las moléculas de colágeno y los huecos entre ellas son la causa de las estriaciones transversales características de las fibrillas. (B, J. Gross, F. O. Sahmitt y D. Fawcett/Visuals Unlimited.)

asocian en una estructura regular y discontinua (Fig. 14.13). Estas fibras no se forman dentro de la célula, porque los colágenos fibrilares se sintetizan como un precursor soluble (**procolágeno**) que contiene segmentos no helicoidales en ambos extremos de la cadena polipeptídica. El procolágeno se escinde para dar colágeno después de su secreción, de tal manera que el ensamblaje del colágeno en fibrillas sólo se produce fuera de la célula. La asociación de las moléculas de colágeno en fibrillas se refuerza debido a que se forman enlaces covalentes transversales entre las cadenas laterales de los restos de lisina e hidroxilisina. Frecuentemente, las fibrillas se asocian además unas con otras para formar fibras de colágeno, las cuales pueden tener varios micrómetros de diámetro.

Otros tipos de colágeno no forman fibrillas pero desempeñan distintos papeles en las diferentes clases de matrices extracelulares (véase Tabla 14.1). Además de los colágenos fibrilares, los tejidos conectivos contienen colágenos asociados a fibrillas, que se unen a la superficie de las fibrillas del colágeno y las conectan entre sí y a otros componentes de la matriz. Las láminas basales están constituidas por distintos tipos de colágeno, principalmente el colágeno de tipo IV (Fig. 14.14), pero también los tipos VI y XVIII, todos los cuales forman redes. Las repeticiones de Gly-X-Y de estos colágenos se interrumpen frecuentemente por pequeñas secuencias no helicoidales. Debido a estas interrupciones, los colágenos formadores de redes son más flexibles que los colágenos formadores de fibrillas. Como consecuencia, se ensamblan en redes entrelazadas bidimensionales en lugar de en fibrillas. Otro tipo de colágeno forma fibrillas de anclaje que anclan a algunas láminas basales con el tejido conectivo subyacente. Otros tipos de colágeno son las proteínas transmembrana que participan en las interacciones célula-matriz.

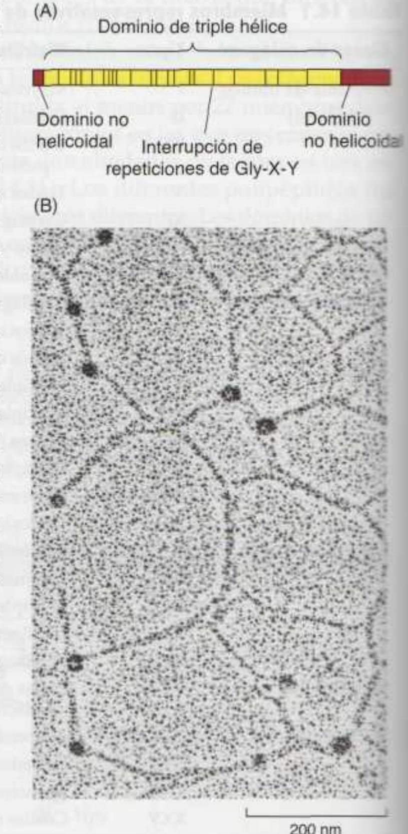


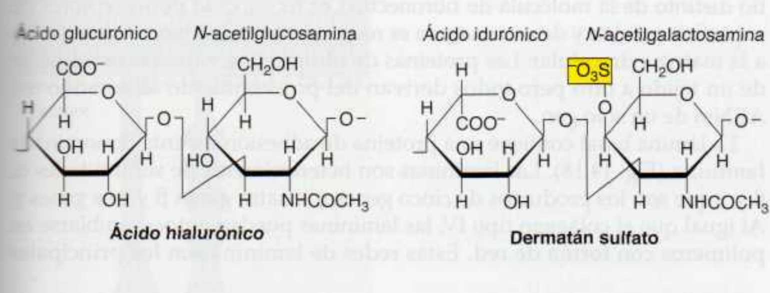
Figura 14.14 Colágeno tipo IV. (A) La estructura repetida de Gly-X-Y del colágeno tipo IV (amarillo) está interrumpida por múltiples secuencias no helicoidales (barras). (B) Micrografía electrónica de una red de colágeno tipo IV. (B, P. D. Yurchenco y J. C. Schittny, 1990. *FASEB J.* 4:1577.)

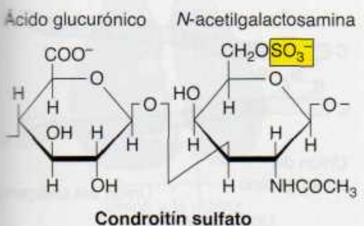
Los tejidos conectivos también contienen **fibras elásticas**, que son particularmente abundantes en aquellos órganos que, regularmente, se extienden y después retornan a su forma original. Los pulmones, por ejemplo, se extienden con cada inspiración y retornan a su forma original con cada exhalación. Las fibras elásticas se componen principalmente de una proteína denominada **elastina** que forma una red, con puentes cruzados mediante enlaces covalentes entre las cadenas laterales de restos de lisina (similares a los del colágeno). Esta red de cadenas de elastina entrelazadas se comporta como una goma elástica, estirándose con la tensión y retornando de golpe a su forma inicial cuando dicha tensión se libera.

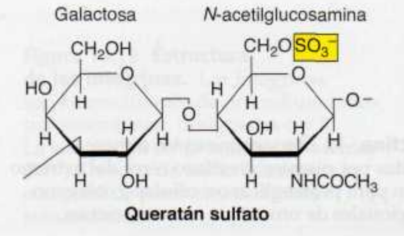
Polisacáridos de matriz

Las proteínas estructurales fibrosas de la matriz extracelular están embebidas en un gel formado a partir de unos polisacáridos denominados **glicosaminoglicanos**, o **GAG**, que están constituidos por unidades repetidas de disacáridos (Fig. 14.15). Uno de los azúcares del disacárido puede ser *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina y el segundo suele ser un ácido (bien ácido glucurónico o ácido idurónico). Con la excepción del ácido hialurónico, estos azúcares se modifican por la adición de grupos sulfato. Por tanto, los GAG tienen una carga negativa elevada. Al igual que las pectinas de las paredes celulares vegetales, se unen a iones cargados positivamente y atrapan moléculas de agua para formar geles hidratados, proporcionando así un soporte mecánico a la matriz extracelular. Los GAG son dermatán sulfato, condrotín sulfato, queratán sulfato y heparán sulfato.

El ácido hialurónico es el único GAG que aparece como una única cadena larga de polisacárido. De forma semejante a la celulosa la quitina, es sintetizado en la membrana plasmática por una hialurónico sintasa transmembrana. Todos los demás GAG se unen a proteínas para formar **proteoglicanos**, que están constituidos hasta por un 95% de polisacáridos en peso. Los proteoglicanos pueden contener desde solamente una o hasta más de cien cadenas de GAG unidas a restos de serina de una proteína central. Se han identificado varias proteínas centrales (que abarcan desde 10 a >500 kDa), por lo que los proteoglicanos son un grupo diverso de macromoléculas. Además de ser componentes de la matriz extracelular, algunos proteoglicanos como los sindecanos (con α-hélices transmembrana) y glipicanos (con anclajes de GPI) son proteínas de la superficie celular que intervienen en la







Ácido idurónico N-acetilglucosamina

Heparán sulfato

Figura 14.15 Tipos principales de glicosaminoglicanos. Los glicosaminoglicanos están constituidos por la repetición de unidades de disacáridos. Con la excepción del ácido hialurónico, los azúcares suelen contener sulfato.

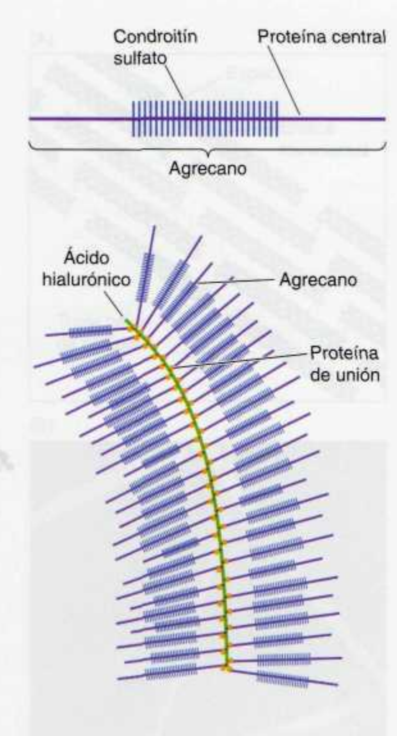


Figura 14.16 Complejos de agrecano y ácido hialurónico. El agrecano es un gran proteoglicano constituido por más de 100 cadenas de condroitín sulfato unidas a una proteína central. Múltiples moléculas de agrecano se unen a largas cadenas de ácido hialurónico, formando grandes complejos en la matriz extracelular del cartílago. Esta asociación se estabiliza por proteínas de unión.

adhesión celular. Algunos de estos proteoglicanos son proteínas de la superficie celular que funcionan junto con las integrinas en la adhesión célula-célula y célula-matriz.

Algunos proteoglicanos interaccionan con el ácido hialurónico para formar grandes complejos en la matriz extracelular. Un ejemplo bien conocido es el agrecano, el principal proteoglicano del cartílago (Fig. 14.16). Más de cien cadenas de condroitín sulfato se unen a una proteína central de aproximadamente 250 kDa, formando un proteoglicano de casi 3.000 kDa. Múltiples moléculas de agrecano se asocian con cadenas de ácido hialurónico, constituyendo grandes agregados (>100.000 kDa) que quedan atrapados en la red de colágeno. Los proteoglicanos también interaccionan con el colágeno y con otras proteínas de la matriz para formar redes gelatinosas en las que las proteínas estructurales fibrosas de la matriz extracelular están embebidas. Por ejemplo, el perlecano (el principal proteoglicano heparán sulfato de la lámina basal) se une tanto al colágeno tipo IV como a la proteína de adhesión laminina, que se describirá posteriormente.

Proteínas de adhesión a la matriz

Las proteínas de adhesión a la matriz, la última clase de constituyentes extracelulares de la matriz, son responsables de unir los componentes de la matriz entre sí y a las superficies celulares. Interaccionan con el colágeno y con los proteoglicanos para especificar la organización de la matriz y son los principales sitios de unión a las integrinas.

El prototipo de estas moléculas es la **fibronectina**, que es la principal proteína de adhesión de los tejidos conectivos. La fibronectina es una glicoproteína dimérica constituida por dos cadenas polipeptídicas, conteniendo cada una cerca de 2.500 aminoácidos (Fig. 14.17). Además, la fibronectina se dispone en la matriz extracelular a modo de una red de fibrillas. La fibronectina tiene sitios de unión para el colágeno y para los GAG, por lo que actúa como un puente de unión entre estos componentes de la matriz. Un sitio distinto de la molécula de fibronectina es reconocido por receptores de superficie celular, y de esta manera es responsable de la unión de las células a la matriz extracelular. Las proteínas de fibronectina varían enormemente de un tejido a otro pero todos derivan del procesamiento alternativo del ARNm de un solo gen.

La lámina basal contiene una proteína de adhesión distinta denominada **laminina** (Fig. 14.18). Las lamininas son heterotrímeros de subunidades α, β y γ que son los productos de cinco genes α, cuatro genes β y tres genes γ. Al igual que el colágeno tipo IV, las lamininas pueden autoensamblarse en polímeros con forma de red. Estas redes de laminina son los principales

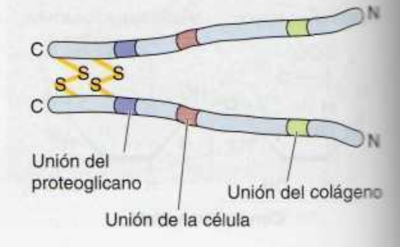


Figura 14.17 Estructura de la fibronectina. La fibronectina es un dímero de cadenas polipeptídicas similares unidas por puentes disulfuro cerca del extremo C-terminal. Se indican los sitios de unión para proteoglicanos, células y colágeno. La molécula también contiene sitios adicionales de unión que no se muestran.

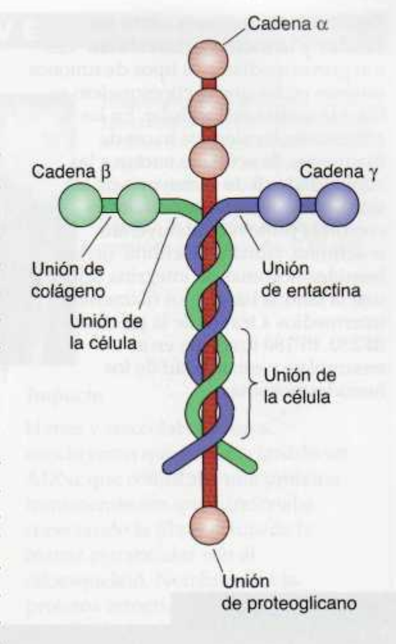


Figura 14.18 Estructura de la laminina. La laminina está constituida por tres cadenas polipeptídicas designadas como α, β y γ. Se indican algunos de los sitios de unión para la entactina, el colágeno tipo IV, los proteoglicanos y los receptores de superficie celular.

componentes estructurales de las láminas basales sintetizadas en los embriones muy tempranos, que no contienen colágeno. Las lamininas también tienen sitios de unión para receptores de superficie celular como integrinas, colágeno de tipo IV y el proteoglicano de heparán sulfato, perlecán. Además, las lamininas están íntimamente asociadas con otra proteína de adhesión, denominada **entactina**, que también se une al colágeno tipo IV. Como resultado de estas múltiples interacciones, la laminina, la entactina, el colágeno de tipos IV, VI y XVIII y los proteoglicanos perlecán y agrina crean redes entrecruzadas en la lámina basal.

Interacciones célula-matriz

Los principales receptores celulares de superficie responsables de la unión de las células a la matriz extracelular son las **integrinas**. Las integrinas son una familia de proteínas transmembrana constituidas por dos subunidades, designadas α y β (Fig. 14.19) y las combinaciones de 18 subunidades α y ocho subunidades β dan lugar a más de 24 integrinas distintas. Las integrinas se unen a secuencias cortas de aminoácidos presentes en múltiples componentes de la matriz extracelular, incluyendo colágeno, fibronectina y laminina. El primero de tales sitios de unión a las integrinas en ser caracterizado fue la secuencia Arg-Gly-Asp, que es reconocida por varios miembros de la familia de las integrinas. Otras integrinas, sin embargo, se unen a secuencias peptídicas diferentes, incluyendo las secuencias de reconocimiento de los colágenos, laminita y varios proteoglicanos. Los proteoglicanos transmembrana de la superficie de varias células también se unen a los componentes de la matriz extracelular y modulan las interacciones célula-matriz.

Además de fijar las células a la matriz extracelular, las integrinas sirven como anclaje para el citoesqueleto (Fig. 14.20). La unión del citoesqueleto a

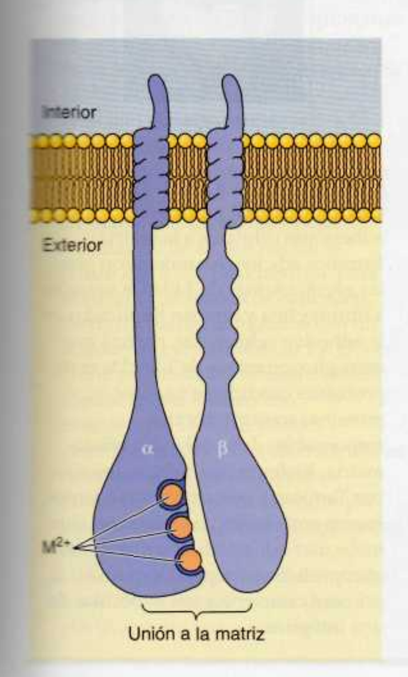


Figura 14.19 Estructura de las integrinas. Las integrinas son heterodímeros de dos subunidades transmembrana, designadas α y β. La subunidad α fija cationes divalentes (M^{2+}). La zona de unión a la matriz se compone de porciones de ambas subunidades.

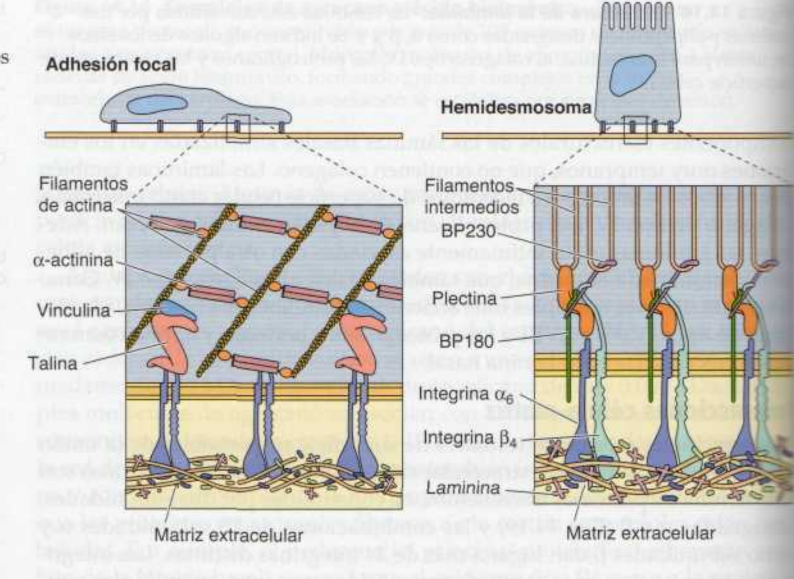


Figura 14.20 Uniones entre las células y la matriz extracelular. Las integrinas median dos tipos de uniones estables en las que el citoesqueleto se fija a la matriz extracelular. En las adhesiones focales, los haces de filamentos de actina se anclan a las subunidades β de la mayoría de las integrinas mediante asociaciones con otras proteínas, incluyendo α-actinina, talina y vinculina. En los hemidesmosomas, la integrina $\alpha_6\beta_4$ une la lámina basal a los filamentos intermedios a través de la plectina y BP230. BP180 funciona en el ensamblaje y estabilidad de los hemidesmosomas.

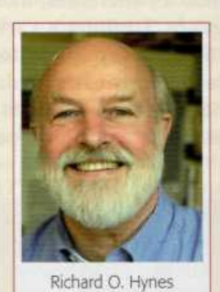


EXPERIMENTO CLAVE

Caracterización de la integrina

Estructura de la integrina, una glicoproteína que participa en la relación transmembrana entre fibronectina y actina

John W. Tamkun, Douglas W. DeSimone, Deborah Fonda, Ramila S. Patel, Clayton Buck, Alan F. Horwitz y Richard O. Hynes
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA (JWT, DWD, DF, RSP y ROH), The Wistar Institute, Philadelphia (CB) and The University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia (AFH)
Cell, Volumen 46, 1986, págs. 271-282



Richard O. Hynes

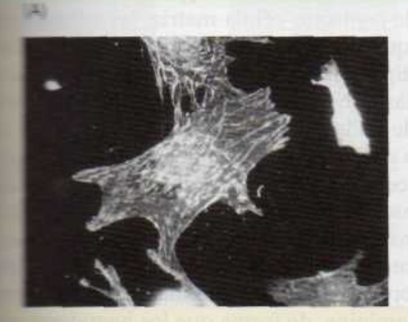
Contexto

La base molecular de la adhesión celular a la matriz extracelular ha sido de interés para los biólogos celulares desde que se observó que la adhesión a la matriz estaba reducida en células cancerosas, potencialmente relacionado con su crecimiento anómalo y su capacidad para metastatizar o extenderse por el cuerpo. Al final de los años 1970 y primeros 1980 el trabajo de varios laboratorios, incluyendo el de Richard Hynes, estableció que existía una relación física entre las fibras de estrés del citoesqueleto de actina y la fibronectina en la matriz extracelular. Muchas de las proteínas citoesqueléticas implicadas en esta relación, incluyendo vinculina y talina, habían sido identificados, pero las proteínas transmembrana críticas que unían a las células con la matriz extracelular seguían siendo desconocidas.

Los candidatos para proteínas transmembrana implicadas en la adhesión celular a la matriz extracelular han sido identificadas empleando anticuerpos preparados por diversos grupos de científicos, incluyendo a Alan Horwitz y Clayton Buck. Estos anticuerpos reconocían un complejo de glicoproteínas de 140 kDa que parecían ser proteínas transmembrana. La inmunofluorescencia y la microscopia inmunoelectrónica localizaron a estas glicoproteínas en puntos de adhesiones celulares a la matriz. Estudios adicionales mostraron que las glicoproteínas de 140 kDa se unían a fibronectina y estaban implicadas en la adhesión celular. Así, parecía que estas glicoproteínas de 140 kDa eran probables candidatos para ser proteínas transmembrana responsables de la adhesión célula-matriz. En los experimentos descritos por Tamkun y cols., estos anticuerpos fueron empleados para aislar un clon molecular que codificaba una de estas glicoproteínas, proporcionando así la primera caracterización molecular de una integrina.

EXPERIMENTO CLAVE

(A)



(B)



Inmunofluorescencia de fibroblastos de embrión de pollo teñidos con el antisuero original frente al complejo de glicoproteínas de 140 kDa (A) o con anticuerpos purificados frente a la proteína expresada a partir de los clones de ADNc (B).

Experimentos

Para aislar un clon molecular que codificaba una de las glicoproteínas de 140 kDa, Tamkun y cols. prepararon una biblioteca de ADNc a partir de ARNm de fibroblastos procedentes de embrión de pollo. Esta biblioteca de ADNc fue preparada en un vector de expresión de bacteriófago γ que dirigía la transcripción y traducción a niveles elevados de los insertos de ADNc eucarióticos en *E. coli* (véase Fig. 4.21). La biblioteca de ADNc contenía aproximadamente 100.000 insertos de ADNc independientes, suficiente para representar clones de todos los ARNm expresados en los fibroblastos de embrión de pollo a partir del cual se había preparado. A continuación, la biblioteca fue analizada con anticuerpos frente a las glicoproteínas de 140 kDa para identificar aquellos fagos recombinantes que portaban los ADNc de interés. Las placas producidas mediante fagos recombinantes individuales fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa, tal y como se haría para analizar una biblioteca recombinante mediante hibridación de ácidos nucleicos (véase Fig. 4.26). Sin embargo, para analizar la biblioteca de expresión, los filtros fueron analizados con un anticuerpo para identificar los clones que expresaban la proteína deseada. Mediante este análisis con anticuerpos, Tamkun y cols. identificaron con éxito diversos clones recombinantes que expresaban proteínas que eran reconocidas por los anticuerpos frente a glicoproteínas de 140 kDa.

Su siguiente reto era determinar si los ADNc clonados codificaban efectivamente una o más de las glicoproteínas de 140 kDa. Con este fin emplean proteínas expresadas por los clones para purificar anticuerpos que reconocían las proteínas clonadas. Adicionalmente, inyectaron conejos con las proteínas clonadas para generar nuevos anticuerpos dirigidos específicamente frente a las proteínas codificadas por los ADNc clonados. Los anticuerpos resultantes reconocían una de las proteínas del complejo de 140 kDa procedentes de fibroblastos de embrión de pollo en ensayos de inmunoblot, estableciendo la relación entre los ADNc clonados con esta proteína. Adicionalmente, anticuerpos purificados frente a proteínas clonadas tiñeron células de forma similar al anticuerpo original en ensayos de inmunofluorescencia, generando un patrón de tinción que correspondía con los puntos de adhesión de fibras de estrés a la matriz extracelular (véase figura). Los resultados tanto del inmunoblot como de la inmunofluorescencia indicaban, por tanto, que los ADNc clonados codificaban una de las proteínas del complejo de glicoproteínas de 140 kDa.

A continuación el ADNc fue secuenciado y se encontró que codificaba una proteína que consistía en 803 aminoácidos. La proteína incluía una secuencia señal amino terminal y una aparente α hélice transmembrana de 23 aminoácidos hidrofóbicos cerca del extremo carboxilo. La secuencia predecía un dominio citosólico corto y un largo dominio extracelular que contenía múltiples sitios de glicosilación, consistente con la estructura esperada de la glicoproteína transmembrana.

Impacto

Hynes y sus colaboradores concluyeron que habían clonado un ADNc que codificaba una proteína transmembrana que funcionaba conectando la fibronectina de la matriz extracelular con el citoesqueleto. Nombraron a la proteína integrina «para denotar su papel como un complejo integral de membrana implicado en la asociación transmembrana entre la matriz extracelular y el citoesqueleto».

El clonaje inicial de la integrina dio lugar a nuestra actual comprensión de la base molecular de las uniones celulares estables. En las adhesiones focales, las integrinas asocian la matriz extracelular con los filamentos de actina. Adicionalmente, las integrinas median la adhesión de células epiteliales a la matriz extracelular en los hemidesmosomas donde se asocian la matriz extracelular con los filamentos intermedios. Así, como fue sugerido por Hynes y sus colaboradores, las integrinas juegan un papel general en la adhesión célula-matriz. Estudios posteriores han demostrado que las integrinas también juegan un papel importante como complejos señalizadores en las células, transduciendo señales desde el exterior celular para controlar múltiples aspectos del movimiento celular, la proliferación y la supervivencia (estudiado en el Cap. 15). La caracterización de las integrinas, por tanto, abrió la puerta no sólo a la comprensión de la naturaleza de la adhesión celular a la matriz, sino también a la dilucidación de nuevos mecanismos de señalización que regulan el comportamiento celular.

la matriz extracelular es la responsable de la estabilidad de las uniones célula-matriz. Distintos tipos de interacciones entre las integrinas y el citoesqueleto se encuentran en dos tipos de contactos célula-matriz, las **adhesiones focales** y los **hemidesmosomas**, que se describieron en el Capítulo 12. Las adhesiones focales anclan varios tipos celulares, incluyendo a los fibroblastos, a la matriz extracelular. En las adhesiones focales, los dominios citoplásmicos de las subunidades β de las integrinas anclan el citoesqueleto de actina mediante su asociación con paquetes de filamentos de actina a través de proteínas de unión a la actina como la α-actinina, talina y vinculina. Los hemidesmosomas median las uniones entre células epiteliales en las que una integrina específica (denominada $\alpha_6\beta_4$) interacciona a través de la plectina y BP230 con los filamentos intermedios en lugar de con la actina. Esto está mediado por la larga cola citoplásmica de la subunidad β_4 de la integrina. La integrina $\alpha_6\beta_4$ se une a la laminina, de forma que los hemidesmosomas anclan las células epiteliales a la lámina basal. Una proteína adicional, BP180, es importante en el ensamblaje y estabilidad de los hemidesmosomas. La plectina y BP230 son miembros de la familia **plaquina**, que es una familia de proteínas implicada en la formación de enlaces con filamentos intermedios tanto en hemidesmosomas como en desmosomas (estudiado en la siguiente sección de este capítulo). BP180 comparte homología de secuencias con los colágenos transmembrana.

Las interacciones célula-matriz, al igual que las interacciones célula-célula estudiadas en la próxima sección, se desarrollan mediante un reclutamiento por pasos de moléculas específicas de las uniones a membranas celulares. Las adhesiones focales se desarrollan a partir de un pequeño grupo de integrinas, denominados **complejos focales**, por el reclutamiento secuencial de la talina, vinculina, α-actinina y otras moléculas del complejo de adhesión. Los complejos focales forman las conexiones iniciales con el citoesqueleto de actina y reclutan formina, que inicia la formación de paquetes de actina (véase Fig. 12.6), y miosina II, que da lugar al desarrollo de tensión en el punto de adhesión. Durante este proceso, los complejos pasan de contener 10 tipos distintos de proteínas a más de 100. La tensión permite la formación de un área mayor de adhesión célula-matriz y el reclutamiento de moléculas señalizadoras (analizado en el Cap. 15) a las uniones celulares. Las adhesiones focales pueden ser interacciones muy estables implicadas en la estructura tisular, o pueden renovarse rápidamente a medida que las células se desplazan (véase Fig. 12.34). Durante la migración celular, la formación de nuevos complejos focales en el frente de avance de la célula resulta en la pérdida de tensión en las viejas uniones focales, dando lugar a la inactivación de la unión de las integrinas a la matriz extracelular.

El progreso reciente en el análisis de la estructura de integrinas, ha permitido la comprensión de los cambios regulados en la actividad de las integrinas que subyace el rápido ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales durante el movimiento celular. La capacidad de las integrinas para unir reversiblemente componentes de la matriz depende de su capacidad para cambiar de conformación entre su estado activo e inactivo (Fig. 14.21). En su estado inactivo, las integrinas son incapaces de unirse a la matriz porque los grupos de la cabeza que contienen el dominio de unión al ligando se encuentran cerca de la superficie celular. Las señales desde el citosol, vía unión a talina o vinculina, cambian la conformación de los dominios citosólicos y extracelulares de las integrinas, extendiendo los grupos de la cabeza hacia el interior de la matriz y permitiendo su unión al ligando. Esto a su vez transmite una señal al citosol que permite a la célula responder a la unión de la integrina y recluta integrinas adicionales a los puntos de adhesión, dando lugar a la formación de adhesiones focales. Señalizaciones subsiguientes desde el interior celular pueden causar el cambio conformacional

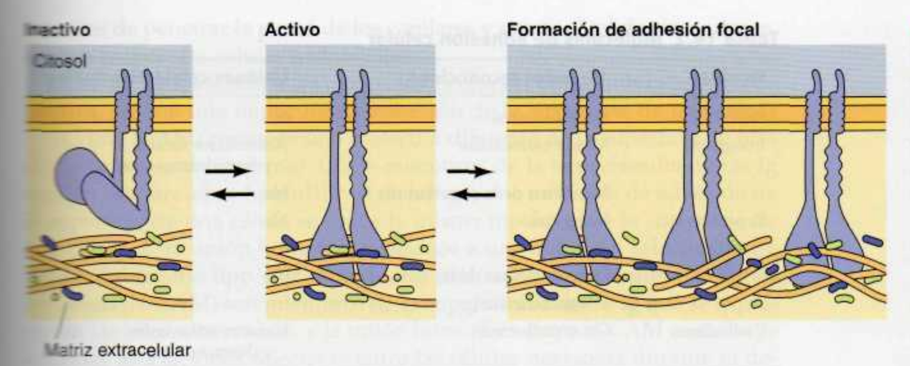


Figura 14.21 La activación de las integrinas. En su estado inactivo, los grupos de la cabeza de las integrinas se mantienen próximas a la superficie celular. Las señales desde el citosol activan a las integrinas, de forma que los grupos de las cabezas se extienden permitiendo su unión con la matriz extracelular. Esto desencadena el reclutamiento de integrinas adicionales y de la formación de adhesiones focales. En las células en migración, el cambio opuesto de conformaciones puede disociar a las integrinas de la matriz.

inverso y disociar la integrina de su ligando, dando lugar al desensamblaje de las adhesiones focales.

De manera similar a las células vegetales, que modifican sus paredes celulares para crecer, las células animales modifican la matriz extracelular conforme crecen y migran. Las células secretan varios tipos de enzimas que modifican glucosaminoglicanos (como hialuronidasas y condroitinasas), así como una familia extensa de proteasas. Una de las primeras proteasas identificadas fue una enzima que digería colágeno (colagenasa), descubierta en 1962 por el grupo de Jerome Gross y Charles Lapiere en colas de renacuajos de rana en fase de metamorfosis. Esta enzima se convirtió en el primer componente de lo que después sería la familia de metaloproteasas de matriz, que integra a 23 proteasas diferentes en el ser humano (24 en el ratón). Estas enzimas se ocupan de degradar diversas proteínas de matriz, como colágenos, laminina y perlecán, además de receptores de superficie celular y moléculas de adhesión. En muchos casos, la escisión del sustrato proteico por acción de la metaloproteasa da lugar a la liberación de fragmentos peptídicos dotados de actividades biológicas independientes. Por ejemplo, una reacción de escisión de laminina genera un péptido que favorece la migración celular.

Interacciones célula-célula

Las interacciones directas entre las células, al igual que entre las células y la matriz extracelular, son críticas para el desarrollo y para la función de los organismos pluricelulares. Algunas interacciones célula-célula son transitorias, como las interacciones entre las células del sistema inmunitario y las interacciones que dirigen a los glóbulos blancos sanguíneos a los lugares de inflamación tisular. En otros casos, las uniones estables célula-célula desempeñan un papel clave en la organización de las células en los tejidos. Por ejemplo, varios tipos diferentes de uniones estables célula-célula son críticas para el mantenimiento y la función de las láminas de células epiteliales. Además de mediar la adhesión celular, tipos especializados de unión proporcionan mecanismos para la rápida comunicación entre células. Las células vegetales también se asocian con las células vecinas no sólo mediante interacciones entre sus paredes celulares, sino también mediante uniones especializadas entre sus membranas plasmáticas.

Uniones adhesivas

La adhesión célula-célula es un proceso selectivo, de tal forma que las células se adhieren solamente a otros tipos específicos de células. Esta selectividad se demostró por primera vez en estudios clásicos de desarrollo embrionario, que mostraban que las células de un tejido (p. ej., el hígado) se adhieren específicamente a células del mismo tejido antes que a células de

Tabla 14.2 Moléculas de adhesión celular

Familia	Ligandos reconocidos	Uniones celulares estables
Selectinas	Carbohidratos	No
Integrinas	Matriz extracelular	Adhesiones focales y hemidesmosomas
	Miembros de la superfamilia Ig	No
Superfamilia de Ig	Integrinas	No
	Otras proteínas de la superfamilia Ig	No
Cadherinas	Otras cadherinas	Uniones adherentes y desmosomas

un tejido diferente (p. ej., cerebro). Esta adhesión célula-célula selectiva viene mediada por proteínas transmembrana denominadas **moléculas de adhesión celular**, que pueden dividirse en cuatro grupos principales: las **selectinas**, las **integrinas**, la **superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig)** (llamadas así debido a que contienen dominios estructurales similares a las inmunoglobulinas), y las **cadherinas** (Tabla 14.2). Las adhesiones celulares mediadas por selectinas, integrinas y la mayoría de las cadherinas requieren Ca^{2+}, Mg^{2+} o Mn^{2+}, de modo que muchas de las interacciones adhesivas entre células son dependientes de cationes divalentes.

Las selectinas median interacciones transitorias entre los leucocitos y las células endoteliales o las plaquetas sanguíneas. Existen tres miembros de la familia de las selectinas: L-selectina, que se expresa en los leucocitos; E-selectina, que se expresa en las células endoteliales; y P-selectina, que se expresa en las plaquetas. Como se estudió en el Capítulo 13, las selectinas reconocen a los carbohidratos de la superficie celular (véase Fig. 13.15). Uno de sus papeles clave es iniciar las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales durante la migración de los leucocitos desde la circulación a los lugares de inflamación tisular (Fig. 14.22). Las selectinas median la adhesión inicial de los leucocitos a las células endoteliales. Tras esto se forman adhesiones más estables, en las que las integrinas de la superficie de los leucocitos se unen a moléculas de adhesión intracelular (ICAM), que son miembros de la superfamilia de las Ig que se expresan en la superficie de las células endoteliales. Los leucocitos firmemente sujetos son capaces

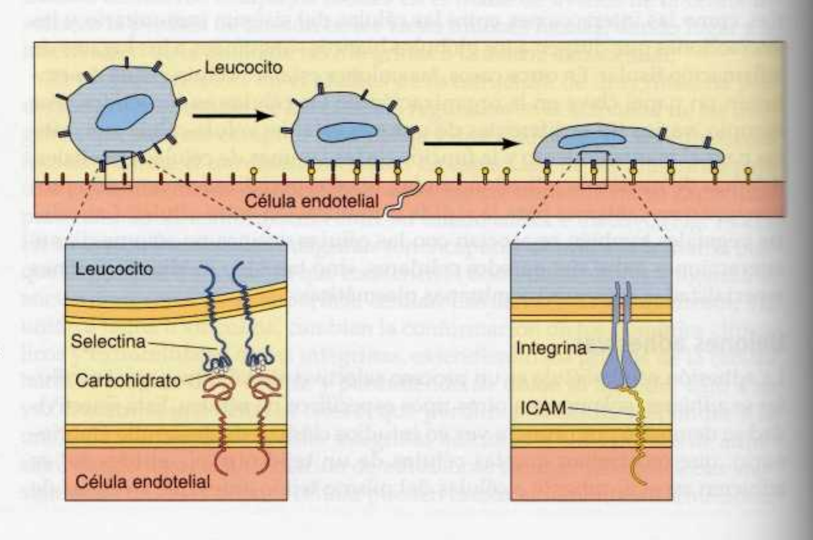


Figura 14.22 Adhesión entre los leucocitos y las células endoteliales. Los leucocitos abandonan la circulación en los lugares de inflamación tisular interaccionando con las células endoteliales de las paredes de los capilares. El primer paso en esta interacción es la unión de las selectinas leucocitarias a los ligandos de carbohidrato de la superficie de la célula endotelial. A este paso le siguen interacciones más estables entre las integrinas y moléculas de adhesión intercelular (ICAM) —pertenecientes a la superfamilia de las Ig— en las células endoteliales.

entonces de penetrar la pared de los capilares y entrar al tejido circundante, migrando entre las células endoteliales.

La unión de las ICAM a las integrinas es un ejemplo de **interacción heterofílica**, en que una molécula de adhesión de la superficie de una célula (p. ej., una ICAM) reconoce una molécula diferente de la superficie de otra célula (p. ej., una integrina). Otros miembros de la superfamilia de las Ig median **interacciones homofílicas**, en las que una molécula de adhesión de la superficie de una célula se une a la misma molécula de la superficie de otra célula. Esta unión homofílica conduce a una adhesión selectiva entre células del mismo tipo. Por ejemplo, las moléculas de adhesión de células nerviosas (*N*-CAM) son miembros de la superfamilia de las Ig que se expresan en las células nerviosas, y la unión homofílica entre *N*-CAM contribuye a formar asociaciones selectivas entre las células nerviosas durante el desarrollo. Existen más de cien miembros de la superfamilia de las Ig, los cuales median diversas interacciones célula-célula.

La cuarta clase de moléculas de adhesión celular son las cadherinas. Las cadherinas están implicadas en la adhesión selectiva entre células embrionarias, la formación de sinapsis específicas en el sistema nervioso, y son las proteínas principalmente responsables del mantenimiento de las uniones estables entre células en los tejidos. Las cadherinas son una gran familia de proteínas (unos 80 miembros) que comparten un dominio extracelular altamente conservado que median interacciones principalmente hemofílicas. Por ejemplo, la E-cadherina se expresa en la superficie de células epiteliales de modo que las interacciones hemofílicas entre E-cadherinas da lugar a la adhesión selectiva entre células epiteliales. Debe mencionarse que la pérdida de E-cadherina puede contribuir al desarrollo de cánceres que surgen de tejidos epiteliales, ilustrando la importancia de las interacciones célula-célula en el control del comportamiento celular. Diferentes miembros de la familia de las cadherinas, como la N-cadherina (cadherina neural) y la P-cadherina (cadherina placentaria), median la adhesión selectiva a otros tipos celulares. Hay diversas subfamilias de cadherinas (cadherinas clásicas, cadherinas desmosómicas, cadherinas semejantes a lípidos y cadherinas de siete dominios transmembrana) que difieren principalmente en sus dominios transmembrana y citosólicos.

Las interacciones célula-célula mediadas por selectinas, integrinas y la mayoría de los miembros de la superfamilia de las Ig son generalmente temporales, si bien las proteínas de la superfamilia de las Ig (como N-CAM) intervienen en la creación de uniones estables en las sinapsis neuronales. No obstante, las uniones de adhesión estable entre el citoesqueleto de células adyacentes suelen basarse en las cadherinas. Como se analizó en el Capítulo 12, estas uniones célula-célula son de dos tipos: **uniones adherentes** y **desmosomas**. En estas uniones, las cadherinas clásicas y desmosómicas están unidas a los paquetes de actina y filamentos intermedios, respectivamente, mediante al interacción de sus colas citosólicas con la β-catenina o con la desmoplaquina. El papel de las cadherinas en asociar los citoesqueletos de células adyacentes es, por tanto, análogo al de las integrinas en formar uniones estables entre células y la matriz extracelular.

La unidad estructural básica de una unión adherente se compone de β-catenina, p120 y α-catenina, además de las cadherinas clásicas transmembrana (Fig. 14.23). La β-catenina y la p120 pertenecen a la familia de las proteínas armadillo (que reciben su nombre de la proteína β-catenina de *Drosophila*). Se unen a la cola citosólica de las cadherinas para mantener la estabilidad de las uniones. Por otra parte, la β-catenina se une a la α-catenina. A pesar de su nombre, la α-catenina no forma parte de la familia de las proteínas armadillo, sino que está más relacionada con la vinculina. Desempeña una función clave en la asociación de las uniones adherentes con el ci-

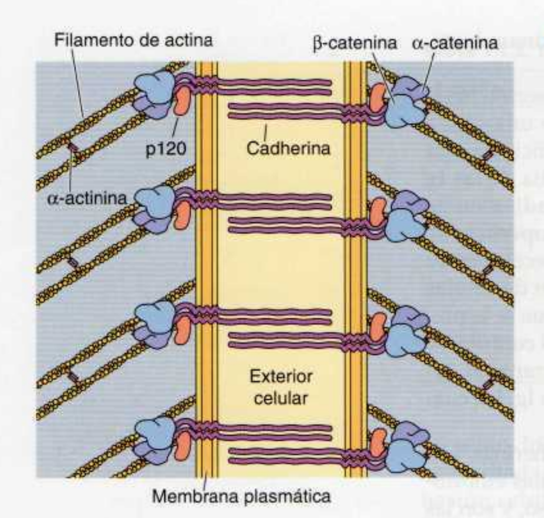


Figura 14.23 Uniones adherentes. En las uniones adherentes, las cadherinas se unen a filamentos de actina. La β-catenina y la p120 se unen a las colas citosólicas de aquellas. Además, la β-catenina se une a la α-catenina, que asociaría a los filamentos de actina con las uniones adherentes a través de la regulación de su ensamblaje y organización.

toesqueleto de actina, aunque aún no se ha descubierto el mecanismo de funcionamiento de la α-catenina. Los datos más modernos indican que no se uniría directamente a los filamentos de actina, aunque podría hacerlo a otras proteínas de unión a estos filamentos. Otra posibilidad sería que actuara anclando los filamentos de actina a las uniones adherentes de manera indirecta a través de la regulación de su ensamblaje y organización. En cualquier caso, la α-catenina y la β-catenina asocian el citoesqueleto de actina de una célula al de otra célula adyacente por medio de las camerinas transmembrana.

Además de las cadherinas, un segundo tipo de molécula de adhesión celular, la **nectina**, también se encuentra presente en las uniones adherentes. Existen cuatro nectinas conocidas y una familia de proteínas semejantes a la nectina, que son miembros de la superfamilia de las Ig. Al igual que las cadherinas, las nectinas interaccionan de forma homofílica, pero las nectinas también pueden unirse heterofílicamente a diferentes nectinas de la membrana de la célula opuesta. Las nectinas también están implicadas en las asociaciones con el citoesqueleto de actina, pero su principal papel parece residir en la formación de uniones. En particular, parece que las adhesiones celulares están mediadas inicialmente por interacciones entre las nectinas, que a continuación reclutan cadherinas a los sitios de adhesión. Las cadherinas a continuación reclutan a las proteínas de unión a la actina, como la vinculina, para comenzar el ensamblaje de una unión adherente madura.

Los desmosomas asocian directamente los citoesqueletos de filamentos intermedios de células adyacentes (Fig. 14.24). Las cadherinas transmembrana, **desmogleína** y **desmocolina**, se unen mediante interacciones heterofílicas a través de la unión. Las proteínas de la familia armadillo placoglobina y placofilina se unen a las colas citosólicas de las cadherinas y proporcionan un enlace directo con la proteína de unión a filamentos intermedios, desmoplaquina. La desmoplaquina es un miembro de la familia plaquina y está relacionada con la plectina, que funciona análogamente en los hemidesmosomas (véase Fig. 14.20). La fuerza de las uniones desmosómicas entre células es una propiedad tanto de los filamentos intermedios a los que se unen como a las múltiples interacciones entre placoglobina, placofilina y desmoplaquina que unen los filamentos intermedios a las cadherinas. La variación tisular de las características de los desmosomas se logra a través de la existencia de numerosos genes que codifican cadherinas desmosómicas y proteínas de la familia de armadillo.

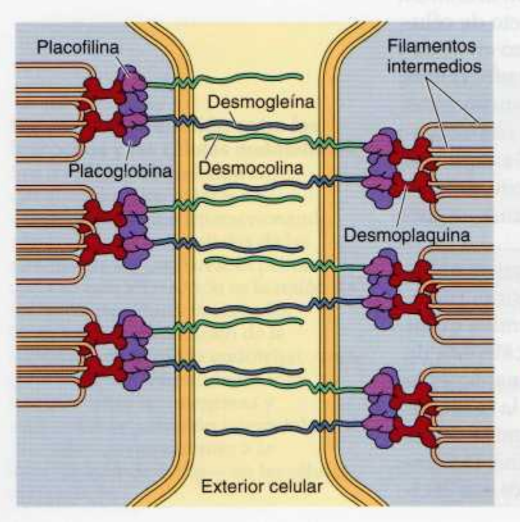


Figura 14.24 Desmosomas. En los desmosomas, las cadherinas desmosómicas (desmogleína y desmocolina) se asocian con los filamentos intermedios. Las proteínas de la familia armadillo placoglobina y placofilina se unen a las colas citosólicas de las cadherinas. También se unen a la desmoplaquina, que se une a los filamentos intermedios.

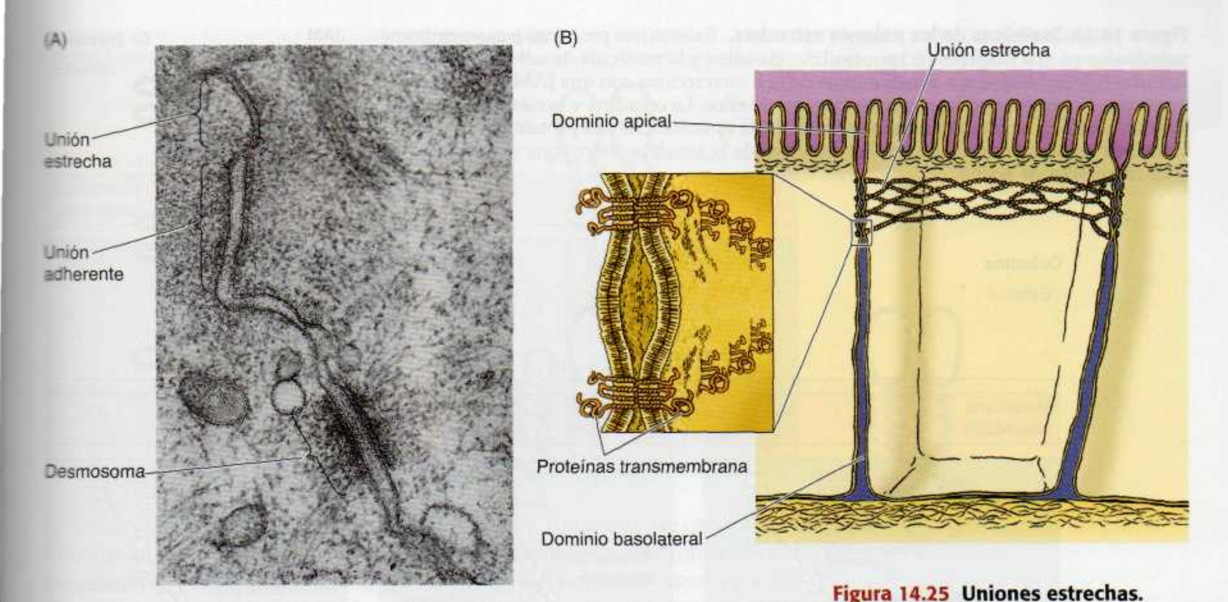


Figura 14.25 Uniones estrechas. (A) Micrografía electrónica de células epiteliales unidas por un complejo de unión, que incluye una unión estrecha, una unión adherente y un desmosoma. (B) Las uniones estrechas se forman por interacciones entre hebras de proteínas transmembrana de las células adyacentes. (A, Don Fawcett/ Photo Researchers, Inc.)

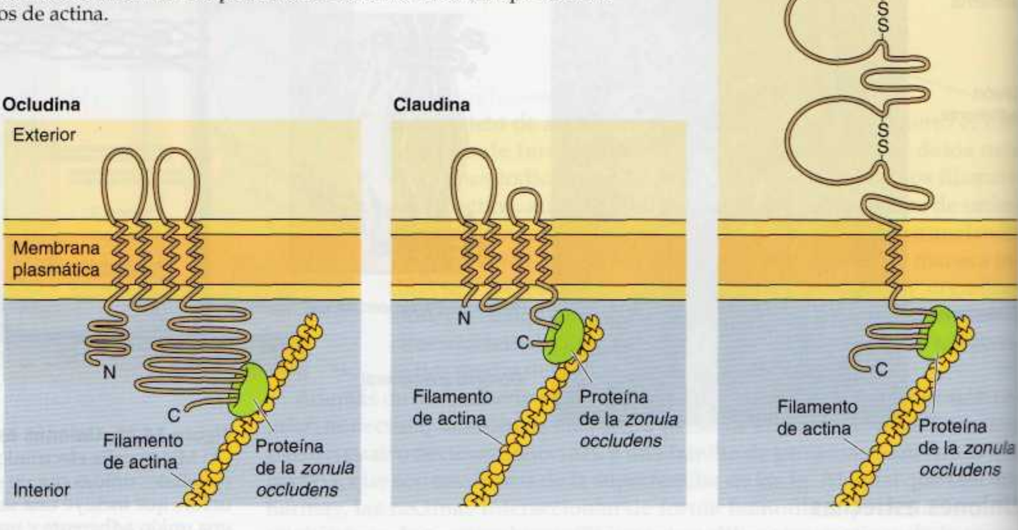
Uniones estrechas

Las **uniones estrechas** son críticamente importantes para la función de las láminas de células epiteliales como barrera entre compartimentos fluidos. Por ejemplo, el epitelio intestinal separa la luz del intestino del tejido conectivo subyacente, que contiene capilares sanguíneos. Las uniones estrechas juegan dos papeles para permitir que los epitelios cumplan con dichas funciones de barrera. En primer lugar, las uniones estrechas forman sellos que previenen el paso libre de moléculas (incluyendo los iones) entre las células de las láminas epiteliales. En segundo lugar, las uniones estrechas separan los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática, impidiendo la libre difusión de lípidos y proteínas de membrana entre ellos. Como consecuencia, existen sistemas de transporte especializados en los dominios apical y basolateral capaces de controlar el tráfico de moléculas entre los distintos compartimentos extracelulares, como el transporte de glucosa entre la luz intestinal y el suministro sanguíneo (véase Fig. 13.35). Mientras que las uniones estrechas son sellos muy efectivos del espacio extracelular, proporcionan una mínima fuerza adhesiva entre células opuestas, de modo que generalmente se asocian con uniones adherentes y desmosomas para formar un **complejo de unión** (Fig. 14.25).

Las capas de células epiteliales constituyen barreras significativas frente a los microorganismos invasores. Las bacterias patogénicas han desarrollado estrategias que alteran los complejos de unión, permitiéndoles penetrar entre las células de las láminas epiteliales.

Las uniones estrechas son los contactos más estrechos conocidos entre células adyacentes. Originalmente fueron descritos como sitios de aparente fusión entre las caras externas de las membranas plasmáticas, aunque actualmente está claro que las membranas no se fusionan. Por el contrario, las uniones estrechas están formadas por una red de hebras proteicas que continúan a lo largo de toda la circunferencia celular (véase Fig. 14.25B). Cada hebra de estas redes está compuesta por proteínas transmembrana de la ocludina, la claudina, y de moléculas de adhesión de las uniones (JAM: *junctional adhesion molecules*) (Fig. 14.26). Estas tres proteínas se unen a proteínas similares en células adyacentes, sellando así el espacio entre las membranas plasmáticas. Las colas citosólicas de las ocludinas, las claudinas, y JAM también se asocian con proteínas de la familia de la *zonula occludens*, que asocian el complejo de unión estrecha con el citoesqueleto de actina y mantienen a la unión estrecha en su localización en la membrana plasmática. Las

Figura 14.26 Proteínas de las uniones estrechas. Existen tres proteínas transmembrana principales en una unión estrecha: ocludina, claudina y la molécula de adhesión de las uniones (JAM). JAM posee dos dominios de Ig e interacciona con una JAM en la célula opuesta a través del dominio más N-terminal de ellos. La ocludina y la claudina interaccionan con moléculas similares en la célula opuesta. Las tres proteínas transmembrana interaccionan con las proteínas de la *zonula occludens* que se unen a los filamentos de actina.

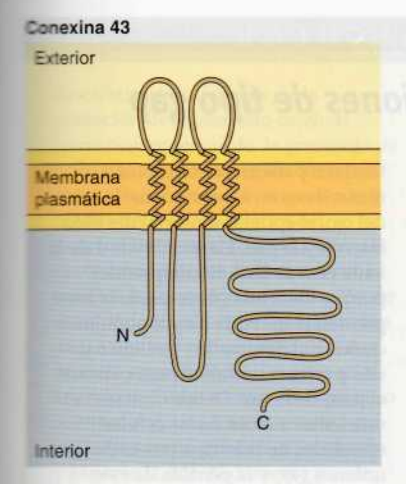


nectinas también pueden estar presentes en las uniones estrechas, pero su papel principal parece estar en el reclutamiento de claudinas para iniciar la formación de uniones estrechas, de forma análoga a su papel en la formación de uniones adherentes.

Uniones de tipo *gap*

Las actividades de células individuales en los organismos multicelulares deben estar estrechamente coordinadas. Esto puede conseguirse mediante moléculas señalizadoras que son liberadas por una célula y actúan sobre otra, como se analiza en el Capítulo 15. Sin embargo, en un tejido individual, como el hígado, las células a menudo se encuentran unidas mediante **uniones de tipo *gap***, que proporcionan conexiones directamente entre los citoplasmas de células adyacentes. Las uniones *gap* son canales abiertos a través de la membrana plasmática, que permiten la libre difusión de iones y pequeñas moléculas (inferiores a aproximadamente mil dalton) entre células vecinas, pero que impiden el paso de proteínas y ácidos nucleicos. Como consecuencia, las uniones *gap* acoplan tanto las actividades metabólicas como las respuestas eléctricas de las células que conectan. La mayoría de las células en los tejidos animales —incluyendo células epiteliales, células endoteliales y las células del músculo cardíaco y liso— se comunican mediante uniones *gap*. En células eléctricamente excitables, como las células del músculo cardíaco, el paso directo de iones a través de uniones *gap* acopla y sincroniza las contracciones de las células vecinas. Las uniones *gap* también permiten el paso de algunas moléculas de señalización intracelular, como el AMPc y el Ca^{2+}, entre células adyacentes, potencialmente coordinando las respuestas celulares en los tejidos.

Las uniones de tipo *gap* están construidas sobre proteínas transmembrana de la familia **conexina**, que consiste en al menos 21 proteínas humanas diferentes (Fig. 14.27). Seis conexinas se ensamblan para formar un cilindro con un poro acuoso abierto en su centro (Fig. 14.28). Este ensamblaje de conexinas, conocido como **conexón**, en la membrana plasmática de una célula



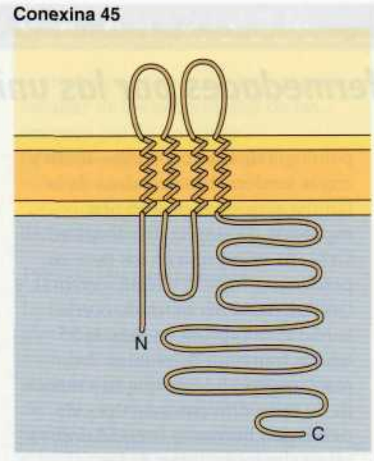
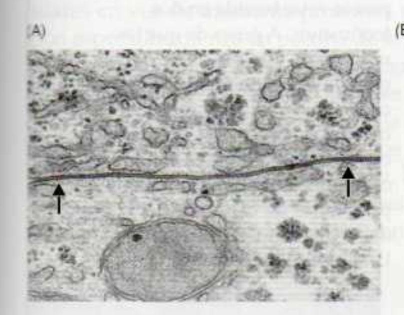


Figura 14.27 Conexinas de las uniones tipo *gap*. La conexina 43 y la conexina 45 son sendos ejemplos de las 21 conexinas distintas identificadas en el ser humano.

se alinea con un conexón de una célula adyacente, formando un canal abierto entre ambos citoplasmas. Las membranas plasmáticas de ambas células están separadas por un espacio que corresponde al espacio ocupado por los dominios extracelulares de las conexinas —de ahí su nombre *«gap junction»*, *gap* significa hueco en inglés, que fue acuñado por los microscopistas electrónicos—. Muchas células expresan más de un miembro de la familia conexina, y combinaciones de diferentes conexinas puede dar lugar a uniones de tipo *gap* con propiedades diversas.

Los ensamblajes especializados de uniones *gap* pueden tener lugar en células nerviosas específicas en todos los eucariotas y forman una **sinapsis eléctrica**. Los conexones individuales en el interior de la sinapsis eléctrica pueden abrirse o cerrarse en respuesta a diversos tipos de señales pero, una vez abiertos, permiten el paso rápido de iones entre dos células nerviosas. La importancia de las uniones *gap* —especialmente en el sistema nervioso— está ilustrado por el número de patologías humanas asociadas con mutaciones en los conexones.



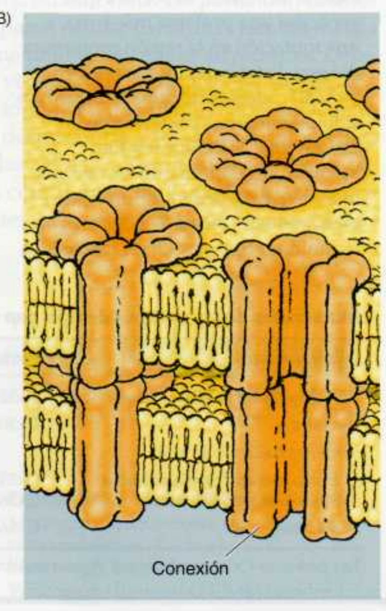
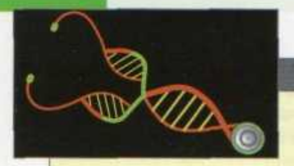




Figura 14.28 Uniones de tipo *gap*. (A) Micrografía electrónica de una unión de tipo *gap* (flechas) entre dos células hepáticas. (B) Las uniones de tipo *gap* están constituidas por ensamblajes de seis conexinas que forman canales abiertos a través de las membranas plasmáticas de las células adyacentes. (A, Don Fawcett y R. Wood / Photo Researches, Inc.)



MEDICINA MOLECULAR

Enfermedades por las uniones de tipo gap

Enfermedades

Se ha descubierto que diversas patologías humanas sin relación entre sí son el resultado de mutaciones de genes que codifican proteínas conexina de las uniones de tipo *gap*. La primera de estas patologías que se describió es la forma ligada al cromosoma X de la patología de Charcot-Marie-Tooth (CMT), que se mapeó a mutaciones en el gen que codificaba la conexina 32 en 1993. El CMT es una patología hereditaria que da lugar a la degeneración progresiva de los nervios periféricos, con una lenta pérdida del control muscular, finalmente degeneración muscular. Se conocen más de 270 mutaciones distintas del gen de la conexina 32 que se vinculan con el CMT. El CMT también puede estar causado por varios genes diferentes que codifican proteínas de mielina, defectos que desencadenan directamente en la degeneración de los nervios mielínicos. Adicionalmente, una forma de CMT ha sido mapeada a una mutación en el gen de la lámina nuclear A (véase Cap. 9 Medicina Nuclear, Patologías de la Lámina Nuclear).

El descubrimiento de que el CMT podría estar causado por mutaciones en una conexina, implicaba que las uniones de tipo *gap* jugaban un papel crítico en los nervios mielinizados. Adicionalmente, el CMT sólo era la primera de varias patologías hereditarias que ahora se han relacionado con mutaciones en genes que codifican conexinas. Las consecuencias patológicas más comunes de las mutaciones en conexinas son las cataratas, trastornos de la piel y la sordera.

Bases moleculares y celulares

El genoma humano contiene 21 genes que codifican distintas conexinas (genes *Cx*), que están divididas en tres subfamilias (α, β y γ). Mutaciones en ocho de estos genes han sido identificadas como causantes de patologías humanas (véase Tabla). Por ejemplo, las mutaciones de *Cx32/β1* están asociadas con la patología de Charcot-Marie-Tooth y con la sordera. Las proteínas de la familia conexinas poseen una expresión de amplia distribución; *Cx32*/β1 se expresa en los nervios periféricos, hígado y tejido cerebral, y *Cx43*α1 (también asociado con la sordera) se expresa en más de 35 tejidos humanos diferentes. Así, resulta sorprendente que hay menos de 10 tipos diferentes de tipos de patologías humanas conocidas cuya causa son mutaciones de las conexinas. Puesto que muchos tejidos expresan diversas proteínas conexinas diferentes, la simple explicación de ausencia de un defecto en muchos tejidos resultante de la pérdida de una sola conexina, es que otras conexinas compensan la función de la que está ausente. La cuestión es, por tanto, por qué una sola mutación cualquiera en un solo gen de conexina causa una patología humana.

El descubrimiento inicial de mutaciones de *Cx32/β1* en CMT estaba basado en ocho mutaciones diferentes en varias familias: seis cambios de una sola base que resultaban en sustituciones no conservativas de los aminoácidos, un cambio del marco de lectura que generaba una proteína más corta, y una mutación en la región promotora del gen. Estas ocho mutaciones en *Cx32/β1*, además de otras 262 que han sido descubiertas posteriormente, causan un CMT clínicamente idéntico, sugiriendo que los nervios mielinizados pueden ser un tejido especialmente sensible a defectos en las uniones tipo *gap*. Otros tres tejidos también parecen ser sensibles a mutaciones en las conexinas: la lente del ojo, el epitelio sensorial del oído interno y la piel. La sensibilidad de la lente es más fácil de comprender, porque las células fibrosas de la lente pierden la mayoría de sus orgánulos durante el desarrollo y se llenan de una proteína cristalina para permitir el paso de la luz. Deben obtener nutrientes e iones de las células epiteliales de la lente a través de las uniones *gap*, y la pérdida de este aporte da lugar a la formación de cataratas. La sensibilidad del epitelio sensorial del oído interno está relacionada con la necesidad de las células epiteliales de intercambiar K^+ rápidamente a través de la comunicación de las uniones *gap*. La base del crecimiento excesivo de las capas externas de la piel está menos clara, pero se cree que las uniones *gap* juegan un papel en el equilibrio entre proliferación y diferenciación, y mutaciones en las uniones *gap* alteran este equilibrio.

Cada uno de estos tejidos expresa conexinas adicionales, y su incapacidad para compensar la pérdida de la conexina mutante parece estar basada en dos fenómenos. A pesar de que las uniones de tipo *gap* pueden formarse por combinaciones de diferentes conexinas, no todas las conexinas son capaces de cooperar para formar conexones funcionales. Así, las conexinas de los tejidos sensibles pueden no ser capaces de compensar de forma eficaz una que está mutada. Un ejemplo llamativo sería el

Mutaciones de las uniones de tipo *gap* en las enfermedades humanas

Enfermedad	Proteína conexina
Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth	Cx32/β1
Sordera	Cx26/β2, Cx30/β6, Cx31/β3, Cx32/β1, Cx43/α1
Enfermedades de la piel	
Eritroqueratodermia variable	Cx31/β3, Cx30,3/β4
Síndrome de Vohwinkel	Cx26/β2
Cataratas	Cx46/α3, Cx50/α8

Las proteínas Cx se nombran por el peso molecular o por la pertenencia a una subfamilia.

MEDICINA MOLECULAR

descubrimiento reciente de la alteración del desarrollo cerebral como consecuencia de la presencia de *Cx26*/β2 y *Cx43*/α1 en los contactos entre células nerviosas migratorias y células de la glía a lo largo del desarrollo del cerebro en el ratón y la desaparición de las conexinas, pero no de la inactivación de su función de canal. Adicionalmente, los conexones de las uniones *gap* son ensamblados no en la superficie celular, sino en el aparato de Golgi o antes en el proceso secretor. Así, una sola conexina mutante que no puede ser procesada y exportada adecuadamente puede actuar como un dominante negativo e interferir con el procesamiento de las conexinas normales expresadas en ese tejido. Esto ha sido descrito recientemente en un mutante de *Cx46*/α3 que causa cataratas congénitas: la proteína mutante no es capaz de salir del CIREG (compartimento intermedio RE-Golgi) o complejo del Golgi, y retiene a las conexinas normales. Parece ser, por tanto, que la relación de determinados trastornos con mutaciones en las conexinas puede resultar de las necesidades de las uniones *gap* de un tejido determinado, además de la naturaleza de las interacciones entre conexinas que son expresadas en dicho tejido.

Prevención y tratamiento

La identificación de diversas patologías humanas causadas por mutaciones en los genes de conexina ilustra la importancia de las uniones de tipo *gap* en la función tisular normal. Al igual que otras uniones críticas para la estructura tisular o la función, las uniones *gap* parecerían ser localizaciones obvias para patologías hereditarias humanas, sin embargo dichas patologías son poco frecuentes. Descubrimientos recientes sobre el procesamiento y ensamblaje de los conexones de las uniones de tipo *gap* han empezado a explicar las bases de estas patologías infrecuentes. Mientras que se cree que todos los genes de conexinas humanas han sido descritos, la distribución tisular de las proteínas —especialmente durante el desarrollo embrionario— sigue siendo poco conocido. Nuevos conocimientos sobe la distribución e interacciones de las proteínas de la familia conexina proporcionará una base para la comprensión de cada una de las patologías resultantes de mutaciones en los genes que codifican conexinas. Sólo entonces podrán desarrollarse posibles terapias compensatorias —por ejemplo, regulando la proliferación celular en la piel o el intercambio de K^+ en el oído interno.

Referencias

Bergoffen, J., S. S. Scherer, S. Wang, M. O. Scott, L. J. Bone, D. L. Paul, K. Chen, M. W. Lensch, P.F. Chance and K.H. Fischbeck. 1993. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262: 2039–2042.

Minogue, P. J., X. Liu, L. Ebihara, E. C. Beyer and V. M. Berthoud. 2005. An aberrant sequence in a connexin 46 mutant underlies congenital cataracts. *J. Biol. Chem.* 280: 40788–40795.

Wei, C. J., X. Xu and C. W. Lo, 2004. Connexins and cell signaling in development and disease. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 811–838.

Plasmodesmas

La adhesión entre las células vegetales tiene lugar a través de sus paredes celulares en vez de mediante proteínas transmembrana. En particular, una región especializada rica en pectina de la pared celular llamada la **lámina media** actúa como un pegamento que mantiene unidas las células adyacentes. Debido a la rigidez de las paredes celulares vegetales, las asociaciones estables entre las células vegetales no requieren la formación de puentes citoesqueléticos, como aquellos proporcionados por los desmosomas y las uniones adherentes de las células animales. Sin embargo, las células vegetales adyacentes se comunican entre sí mediante conexiones citoplasmáticas llamadas **plasmodesmas** (Fig. 14.29). A pesar de ser diferentes en su estructura los plasmodesmas

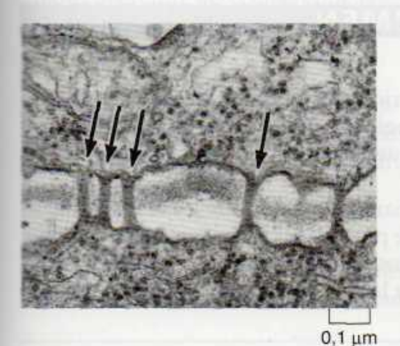
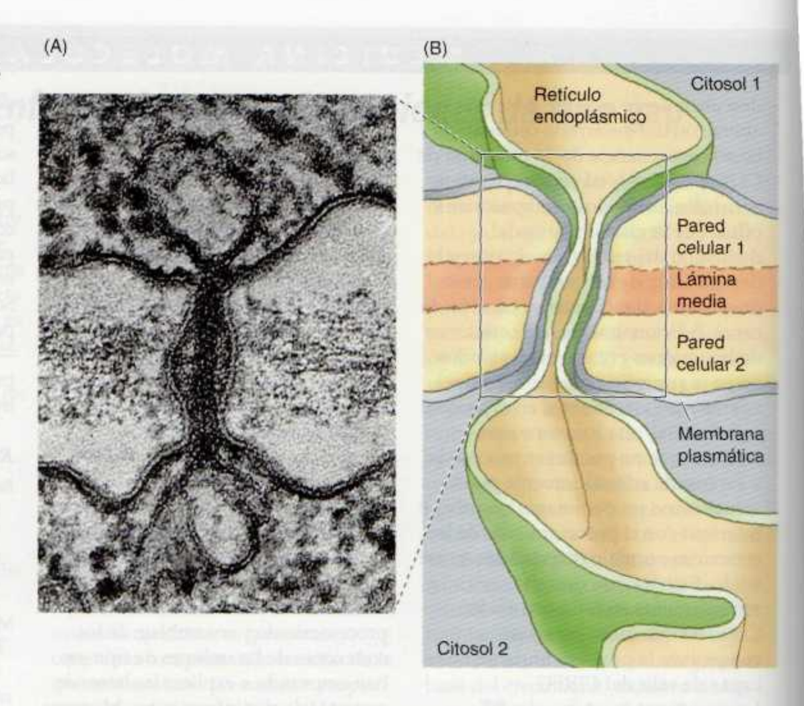


Figura 14.29 Plasmodesmas. Micrografía electrónica de plasmodesmas (flechas). (E. H. Newcomb, University of Wisconsin/Biological Photo Service.)

Figura 14.30 Estructura de los plasmodesmas. En un plasmodesma, las membranas plasmáticas de las células vecinas son continuas, formando canales citoplásmicos a través de las paredes celulares adyacentes. Una extensión del retículo endoplásmico generalmente pasa a través del canal. (A, De Tilney, L., T. J. Cooke, P. S. Connelly y M. S. Tilney. 1991. *J. Cell Biol*. 112: 739-748.)



funcionan de forma análoga a las uniones *gap* como un medio de comunicación directa entre células adyacentes en el interior de los tejidos.

Los plasmodesmas se forman a partir de la separación incompleta de células hijas después de una mitosis vegetal. En cada plasmodesma la membrana plasmática de una célula es continua con la de su vecina, creando un canal abierto entre los dos citosoles (Fig. 14.30). Una extensión del retículo endoplasmático liso pasa a través del poro, dejando un anillo de citoplasma circundante a través del cual los iones y las moléculas pequeñas son capaces de pasar libremente entre las células. Los plasmodesmas son estructuras dinámicas que pueden abrirse o cerrarse en respuesta a los estímulos apropiados, permitiendo el paso regulado de macromoléculas entre células adyacentes. Además, los plasmodesmas pueden expandirse en respuesta a un estímulo apropiado, permitiendo el tránsito regulado de macromoléculas entre las células adyacentes. De esta manera, los plasmodesmas desempeñan un papel clave en el desarrollo vegetal mediante el control del tráfico de moléculas reguladoras, como son los factores de transcripción o los ARN, entre las células.

PALABRAS CLAVE

peptidoglicano

quitina, celulosa,hemicelulosa, pectina, pared celular primaria, pared celular secundaria, lignina, presión de turgencia, auxina, celulosa sintetasa

RESUMEN

PAREDES CELULARES

Paredes celulares bacterianas: El principal componente de las paredes celulares bacterianas es un peptidoglicano constituido por cadenas de polisacáridos unidas transversalmente mediante péptidos cortos.

Paredes celulares eucarióticas: Las paredes celulares de los hongos, algas y plantas superiores se componen de polisacáridos fibrosos (p. ej., celulosa) embebidos en una matriz gelatinosa de polisacáridos y proteínas. Sus paredes celulares rígidas permiten a las células vegetales expandirse rápidamente por la entrada de agua.

RESUMEN

MATRIZ EXTRACELULAR E INTERACCIONES CÉLULA-MATRIZ

Proteínas estructurales de la matriz: Las principales proteínas estructurales de la matriz extracelular son miembros de la gran familia proteica de los colágenos. Los colágenos forman fibrillas que caracterizan la matriz extracelular de los tejidos conectivos, además de formar redes en la lámina basal.

Polisacáridos matriciales: Los polisacáridos en forma de glicosaminoglicanos y proteoglicanos constituyen la mayor parte de la matriz extracelular. Se une y modifican las fibrillas de colágeno e interaccionan con todo el resto de moléculas de la matriz.

Proteínas de adhesión de la matriz: Las proteínas de unión a la matriz asocian a los componentes de la matriz extracelular entre sí y son los principales sitios de unión para las integrinas, que median la mayoría de las adhesiones célula-matriz.

Interacciones célula-matriz: Las integrinas son los principales receptores de la superficie celular que unen las células a la matriz extracelular. En las adhesiones focales y en los hemidesmosomas, las integrinas proporcionan enlaces estables entre la matriz extracelular y los citoesqueletos de actina y de filamentos intermedios, respectivamente.

INTERACCIONES CÉLULA-CÉLULA

Uniones adhesivas: Las interacciones selectivas intercelulares están mediadas por cuatro grupos principales de proteínas de adhesión celular: selectinas, integrinas, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y cadherinas. Las cadherinas unen los citoesqueletos de las células adyacentes en las uniones célula-célula estables.

Uniones estrechas: Las uniones estrechas impiden el libre tránsito de las moléculas entre las células epiteliales, y separan los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática.

Uniones de tipo gap*:* Las uniones de tipo *gap* son canales abiertos que conectan los citoplasmas de las células adyacentes. Las sinapsis eléctricas son uniones de tipo *gap* que median la señalización entre células del sistema nervioso.

Plasmodesmas: Las células vegetales adyacentes se unen a través de conexiones citoplasmáticas denominadas plasmodesmas.

PALABRAS CLAVE

matriz extracelular, lámina basal, colágeno, fibrilla de colágeno, procolágeno, fibra elástica, elastina

glicosaminoglicano (GAG), proteoglicano

fibronectina, laminina, entactina

integrina, adhesión focal, hemidesmosoma, plaquina, complejo focal

molécula de adhesión celular, selectina, integrina, superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), cadherina, interacción heterofílica, interacción homofílica, unión adherente, desmosoma, familia de proteínas armadillo, nectina, desmogleína, desmosolina

unión estrecha, complejo de unión

unión de tipo *gap*, conexina, conexón, sinapsis eléctrica

lámina media, plasmodesma

Preguntas

1. ¿En qué difieren las paredes celulares y sus membranas adyacentes entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas?

2. Una función importante de la bomba de Na^+-K^+ en las células animales es mantener el equilibrio osmótico. ¿Por qué esto no es necesario en las células vegetales?

3. ¿Cómo imparten fuerza estructural las hemicelulosas a las paredes celulares vegetales?

4. ¿Cuál es la importancia de dirigir selectivamente los diferentes transportadores de glucosa a los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática de las células epiteliales intestinales? ¿Cuál es el papel de las uniones estrechas en este proceso?

5. ¿Cómo afectaría un inhibidor de la enzima lisil hidroxilasa (la enzima responsable de hidroxilar residuos de lisina en el colágeno) a la estabilidad del colágeno sintetizado por una célula?

6. ¿Por qué los colágenos formadores de fibrillas no se ensamblan en hélices triples en el interior celular?

7. ¿Qué propiedad de los GAG les permite formar geles hidratados?

8. Estás estudiando un transportador que sólo se encuentra en la membrana plasmática apical de las células epiteliales. Tratas las células epiteliales con un péptido sintético que es similar al dominio extracelular de una proteína de la familia claudina. El transportador ahora se encuentra tanto en el dominio apical como basolateral de la membrana plasmática. ¿Cuál es el mecanismo por el que el péptido altera la localización del transportador?

9. Has sobreexpresado un dominante negativo de E-cadherina que carece de un dominio extracelular en células epiteliales. ¿Cómo afectará esta mutación a la adhesión célula-célula?

10. Una mutación en una célula epitelial da lugar a la expresión de integrina $\alpha_6\beta_4$ con un dominio citoplásmico delecionado. ¿Cómo afectará esta mutación la adhesión de la célula epitelial a la lámina basal?

11. ¿Qué es una sinapsis eléctrica? ¿Qué función sirve?

12. ¿En qué se parecen las uniones de tipo *gap* y las plasmodesmas? ¿Es probable que sean estructuras análogas u homólogas entre los animales y los vegetales?

Bibliografía

Paredes celulares

Lerouxel, O., D. M. Cavalier, A. H. Liepman and K. Keegstra. 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides—a complex process. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 621–630. [R]

Merzendorfer, H. 2006. Insect chitin synthases: a review. *J. Comp Physiol [B]* 176: 1–15. [R]

Paredez, A., A. Wright and D. W. Ehrhardt. 2006. Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 571–578. [R]

Somerville, C. 2006. Cellulose synthesis in higher plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 53–78. [R]

Somerville, C., S. Bauer, G. Brininstool, M. Facette, T. Hamann, J. Milne, E. Osborne, A. Paredez, S. Persson, T. Raab, S. Vorwerk, and H. Youngs. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306: 2206–2211. [R]

Matriz extracelular e interacciones célula-matriz

Arnaout, M. A., S. L. Goodman and J. P. Xiong. 2007. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19: 495–507. [R]

Berrier, A. L. and K. M. Yamada. 2007. Cell-matrix adhesion. *J. Cell Physiol.* 213: 565–573. [R]

Bishop, J. R., M. Schuksz and J. D. Esko. 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446: 1030–1037. [R]

Ginsberg, M. H., A. Partridge and S. J. Shattil. 2005. Integrin regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 509–516. [R]

Handel, T. M., Z. Johnson, S. E. Crown, E. K. Lau and A. E. Proudfoot. 2005. Regulation of protein function by glycosaminoglycans—As exemplified by chemokines. *Ann. Rev. Biochem.* 74: 385–410. [R]

Lecuit, T. 2005. Adhesion remodeling underlying tissue morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 15: 34–42. [R]

Mao, Y. and J. E. Schwarzbauer. 2005. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol.* 24: 389–399 [R]

Miner, J. H. and P. D. Yurchenco. 2004. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 255–284. [R]

Mott, J. D. and Z. Werb. 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 558–564. [R]

Mould, A. P. and M. J. Humphries. 2004. Regulation of integrin function through conformational complexity: Not simply a knee-jerk reaction? *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 544–551. [R]

Myllyharju, J. and K. I. Kivirikko. 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20: 33–43. [R]

Page-McCaw, A., A. J. Ewald and Z. Werb. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 221–233. [R]

Sakisaka, T. and Y. Takai. 2004. Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 513–521. [R]

Tamkun, J. W., D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz, and R. O. Hynes. 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46: 271–282. [P]

Toole, B. P. 2004. Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue. *Nature Rev. Cancer* 4: 528–539. [R]

Wight, T. N. 2002. Versican: A versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 617–623. [R]

Wozniak, M. A., K. Modzelewska, L. Kwong and P. J. Keely. 2004. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim. Biophys. Acta* 1692: 103–119. [R]

Xiao, T., J. Takagi, B. S. Coller, J. H. Wang and T. A. Springer. 2004. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 432: 59–67. [P]

Yurchenco, P. D. and W. G. Wadsworth. 2004. Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 572–579. [R]

Interacciones célula-célula

Bamji, S. X. 2005. Cadherins: Actin with the cytoskeleton to form synapses. *Neuron* 47: 175–178. [R]

Bergoffen, J., S. S. Scherer, S. Wang, M. O. Scott, L.J. Bone, D. L. Paul, K. Chen, M. W. Lensch, P. F. Chance, and K. H. Fischbeck. 1993. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262: 2039–2042. [P]

Cilia, M. L. and D. Jackson. 2004. Plasmodesmata form and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 500–506. [R]

Elias, L. A. and A. R. Kriegstein. 2008. Gap junctions: multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Trends Neurosci.* 31: 243–250. [R]

Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, P. Nava and B. E. Jaramillo. 2003. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81: 1–44. [R]

Green, K. J. and C. L. Simpson. 2007. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J. Invest Dermatol.* 127: 2499–2515. [R]

Heinlein, M. 2002. Plasmodesmata: Dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 543–552. [R]

Hervé, J. C., N. Bourmeyster and D. Sarrouilhe. 2004. Diversity in protein-protein interactions of connexins: Emerging roles. *Biochim. Biophys. Acta* 1662: 22–41. [R]

Kobielak, A. and E. Fuchs. 2004. α-catenin: At the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 614–625. [R]

Laird, D. W. 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* 394: 527–543. [R]

Miranti, C. K. and J. S. Brugge. 2002. Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. *Nature Cell Biol.* 4: E83–E90. [R]

Miyoshi, J. and Y. Takai. 2005. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 815–855. [R]

Niessen, C. M. 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J. Invest Dermatol.* 127: 2525–2532. [R]

Pokutta, S. and W. I. Weis. 2007. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 237–261. [R]

Rela, L. and L. Szczupak. 2004. Gap junctions: Their importance for the dynamics of neural circuits. *Mol. Neurobiol.* 30: 341–357. [R]

Richard, G. 2005. Connexin disorders of the skin. *Clin. Dermatol.* 23: 23–32. [R]

Schneeberger, E. E. and R. D. Lynch. 2004. The tight junction: A multifunctional complex. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 286: C1213–C1228. [R]

Scott, J. A. and A .S. Yap. 2006. Cinderella no longer: α-catenin steps out of cadherin's shadow. *J. Cell Sci.* 119: 4599–4605. [R]

Takeichi, M. 2007. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nature Rev. Neurosci.* 8: 11–20. [R]

Tsukita, S. and M. Furuse. 2002. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 531–536. [R]

van Steensel, M. A. 2004. Gap junction diseases of the skin. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 131C: 12–19. [R]

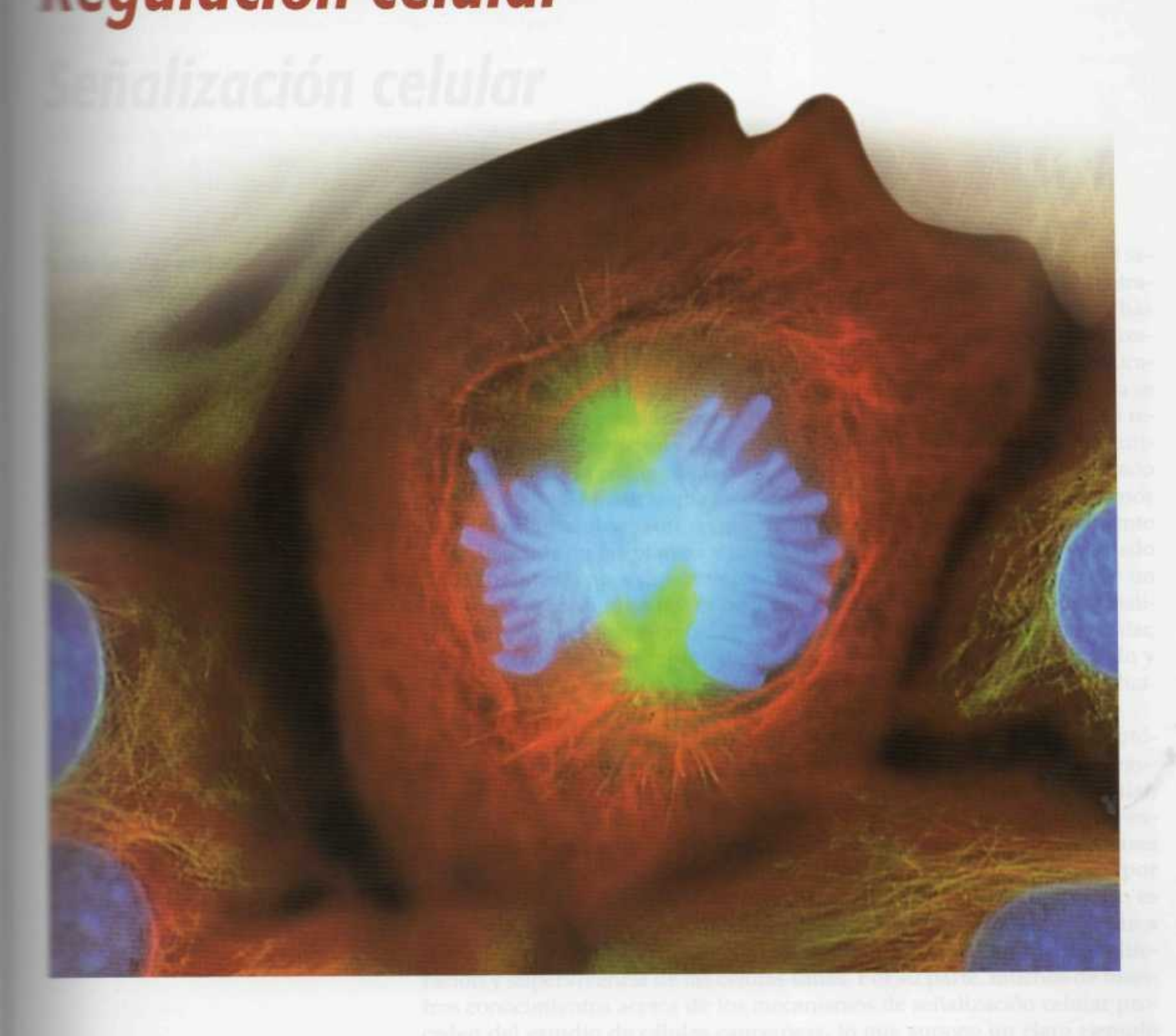
Wei, C. J., X. Xu and C. W. Lo. 2004. Connexins and cell signaling in development and disease. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 811–838. [R]

Yamada, S. and W. J. Nelson. 2007. Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 267–294. [R]

Yin, T. and K. J. Green. 2004. Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15: 665–677. [R]

SECCIÓN IV

Regulación celular



CAPÍTULO **15**

Señalización celular

TODAS LAS CÉLULAS RECIBEN SEÑALES DESDE SU MEDIO Y RESPONDEN A ESTAS SEÑALES. Incluso la bacteria más sencilla capta y se desplaza hacia concentraciones elevadas de nutrientes, como la glucosa o los aminoácidos. Muchas bacterias y eucariotas unicelulares también responden a moléculas señalizadoras secretadas por otras células, permitiendo, de este modo, la comunicación célula-célula. Por ejemplo, el apareamiento entre células de levadura se señaliza mediante péptidos que son secretados por una célula y se unen a receptores en la superficie de la otra. Sin embargo, es en los organismos pluricelulares donde la comunicación célula-célula alcanza su grado más elevado de complejidad. Mientras que las células procariotas y las de los organismos eucariotas unicelulares son, en gran medida, autónomas, el comportamiento de cada célula en las plantas y animales pluricelulares ha de ser regulado cuidadosamente para satisfacer los requerimientos del organismo como un todo. Esto se consigue a través de un amplio repertorio de moléculas señalizadoras que, bien son secretadas, o bien se expresan en la superficie celular, las cuales se unen a receptores expresados en otras células, integrando y coordinando de esta manera las funciones de las distintas células individuales que constituyen organismos tan complejos como el ser humano.

La unión de la mayoría de estas moléculas señalizadoras a sus receptores provoca una cascada de reacciones intracelulares que son las que regulan, en gran medida, los diferentes aspectos del comportamiento celular, incluyendo su metabolismo, la motilidad, la proliferación, su supervivencia y la diferenciación. La comprensión de los mecanismos moleculares que constituyen estas vías de señalización celular se ha convertido, por tanto, en un área prioritaria de investigación. El interés en este campo es aún mayor por el hecho de que muchos tipos de cáncer surgen debido a una alteración en las vías de señalización celular que controlan la proliferación y supervivencia de las células sanas. Por su parte, muchos de nuestros conocimientos acerca de los mecanismos de señalización celular proceden del estudio de células cancerosas, lo que supone un claro ejemplo de la fructífera relación entre la medicina y la investigación básica en la biología molecular y celular.

Moléculas señalizadoras y sus receptores

Son muchos los diferentes tipos de moléculas que transmiten información entre las células de los organismos pluricelulares. Aunque todas ellas actúan como ligandos que se unen a receptores expresados por las células diana, existe una variabilidad considerable en la estructura y función de los distintos tipos de moléculas que actúan como transmisores de señales. En cuanto

a su estructura, el rango de complejidad de las moléculas señalizadoras utilizadas por plantas y animales varía desde los gases sencillos hasta las proteínas. Algunas de estas moléculas transmiten las señales a través de largas distancias, mientras que otras actúan localmente transfiriendo la información entre células vecinas. Además, las moléculas señalizadoras difieren en su modo de acción sobre las células diana. Algunas de estas moléculas son capaces de atravesar la membrana plasmática y se unen a receptores intracelulares en el citoplasma o en el núcleo, mientras que la mayoría se une a receptores que son expresados en la superficie de las células diana. En las secciones siguientes se tratarán los principales tipos de moléculas señalizadoras y los receptores con los que interaccionan. Posteriormente, se abordarán los mecanismos mediante los que los receptores celulares de superficie regulan el comportamiento celular.

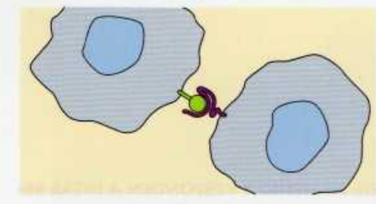
Tipos de señalización célula-célula

La señalización celular tiene lugar bien a través de la interacción directa entre una célula y la célula vecina, bien mediante la acción de moléculas señalizadoras secretadas (Fig. 15.1). La señalización mediante interacción directa célula-célula (o célula-matriz extracelular) desempeña un papel crítico en la regulación del comportamiento de las células en los tejidos animales. Por ejemplo, las integrinas y cadherinas (que fueron tratadas en el capítulo anterior) funcionan no sólo como moléculas de adhesión celular, sino también como moléculas señalizadoras que regulan la proliferación y supervivencia celular en respuesta al contacto célula-célula o célula-matriz extracelular. Además, las células expresan variedad de receptores de superficie que interaccionan con las moléculas señalizadoras de superficie de las células vecinas. Este tipo de señalización mediante interacción directa célula-célula desempeña un papel fundamental en la regulación de las múltiples interacciones que tienen lugar entre los distintos tipos celulares durante el desarrollo embrionario, así como en el mantenimiento de los tejidos adultos.

Los diferentes tipos de señalización mediante moléculas secretadas se suelen dividir en tres grandes clases en función de la distancia recorrida por la molécula señalizadora. En la **señalización endocrina**, las moléculas señalizadoras (**hormonas**) son secretadas por células endocrinas especializadas y se transportan a través de la circulación, actuando sobre células diana localizadas en lugares alejados en el organismo. Un ejemplo clásico lo proporciona la hormona esteroidea estrógeno, que es producida por el ovario y estimula el desarrollo y mantenimiento del sistema reproductor femenino y de los caracteres sexuales secundarios. En los animales se producen más de 50 hormonas distintas por las glándulas endocrinas, entre las que se incluyen la pituitaria, tiroides, paratiroides, páncreas, glándulas suprarrenales y gónadas.

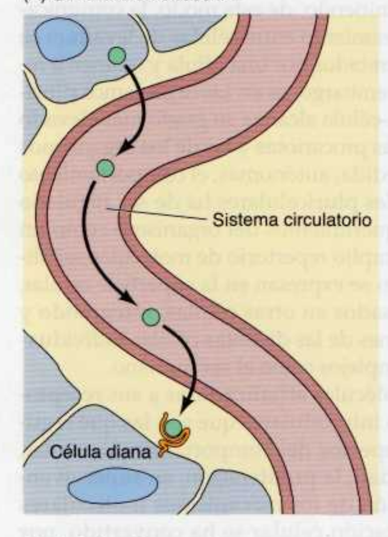
A diferencia de las hormonas, algunas moléculas señalizadoras actúan localmente, afectando al comportamiento de las células próximas. En la **señalización paracrina**, una molécula liberada por una célula actúa sobre las células diana vecinas. Un ejemplo lo proporciona la acción de los neurotransmisores que transportan la señal entre células nerviosas en la sinapsis. Por último, algunas células responden frente a señales que producen ellas mismas. Un ejemplo importante de esta **señalización autocrina** es la respuesta de las células del sistema inmune de los vertebrados frente a antígenos ex-

Señalización directa célula-célula

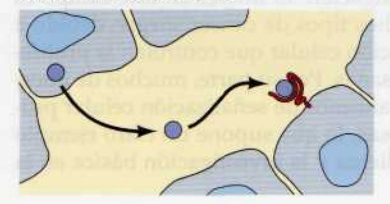


Señalización mediante moléculas secretadas

(A) Señalización endocrina



(B) Señalización paracrina



(C) Señalización autocrina

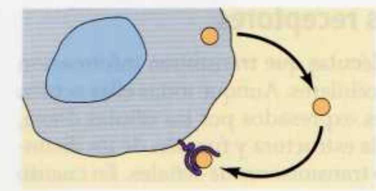


Figura 15.1 Tipos de señalización célula-célula. La señalización celular puede tener lugar bien mediante contacto directo célula-célula, o bien a través de la acción de moléculas señalizadoras secretadas. (A) En la señalización endocrina, las hormonas se transportan a través del sistema circulatorio y actúan sobre células diana alejadas. (B) En la señalización paracrina, la molécula liberada por una célula actúa localmente afectando a células diana próximas. (C) En la señalización autocrina, la célula responde a una molécula señal producida por ella misma.

tamaños. Algunos tipos de linfocitos T responden a la estimulación antigénica sintetizando *un factor de crecimiento que induce su propia proliferación*, lo que supone, por tanto, el aumento del número de linfocitos T con capacidad de respuesta y la amplificación de la respuesta inmune. También merece la pena destacar que una señalización autocrina anormal suele contribuir al crecimiento incontrolado de las células cancerosas (véase Cap. 18). En este caso, la célula cancerosa produce un factor de crecimiento frente al que es susceptible, induciendo continuamente su proliferación incontrolada.

15.1 Animación web

Señalización mediante moléculas secretadas

Durante la señalización endocrina, las hormonas actúan sobre células distantes; en la señalización paracrina, una molécula liberada por una célula actúa sobre dianas cercanas; y en la señalización autocrina una célula produce una molécula señalizadora a la que además responde.

Hormonas esteroideas y superfamilia de receptores de esteroides

Como ya se ha comentado, todas las moléculas señalizadoras actúan mediante la unión a receptores que son expresados por las células diana. En muchos casos, estos receptores se expresan en la superficie de la célula diana, pero otros receptores son proteínas intracelulares que se localizan en el citosol o en el núcleo. Estos receptores intracelulares interaccionan con moléculas señalizadoras pequeñas e hidrofóbicas que son capaces de difundir a través de la membrana plasmática. Las **hormonas esteroideas** son el típico ejemplo de este tipo de moléculas señalizadoras, entre las que también se incluyen la hormona tiroidea, la vitamina D_3, y el ácido retinoico (Fig. 15.2).

Las hormonas esteroideas (que incluyen a la testosterona, estrógeno, progesterona, los corticosteroides y la ecdisona) se sintetizan a partir del colesterol. La **testosterona**, **estrógeno** y **progesterona** son esteroides sexuales que son producidos por las gónadas. Los **corticosteroides** son producidos por la glándula suprarrenal. Estos incluyen a los **glucocorticoides**, que actúan sobre distintos tipos de células estimulando la producción de glucosa, y los **mineralocorticoides**, que actúan sobre el riñón regulando el equilibrio salino e hídrico. La **ecdisona** es una hormona de insectos que desempeña

Testosterona

Estradiol (un estrógeno)

Progesterona

Cortisol (un glucocorticoide)

Aldosterona (un mineralocorticoide)

Hormona tiroidea

Vitamina D_3

Ácido retinoico

Figura 15.2 Estructura de las hormonas esteroideas, hormona tiroidea, vitamina D_3 y ácido retinoico. Los esteroides incluyen a las hormonas sexuales (testosterona, estrógeno y progesterona), glucocorticoides y mineralocorticoides.

un papel fundamental en el desarrollo activando la metamorfosis de la larva a adulto. Los **brasinosteroides** son hormonas esteroídicas específicas de plantas que controlan un cierto número de procesos del desarrollo, incluyendo el crecimiento y diferenciación celular.

Aunque la hormona tiroidea, la vitamina D_3 y el ácido retinoico son estructural y funcionalmente diferentes a los esteroides, comparten un mecanismo de acción común en las células diana. La **hormona tiroidea** se sintetiza a partir de la tirosina en la glándula tiroidea; desempeña un papel importante en el desarrollo y en la regulación del metabolismo. La **vitamina D_3** regula el metabolismo del calcio y el crecimiento del hueso. El **ácido retinoico** y sus derivados (**retinoides**), sintetizados a partir de la vitamina A, juegan un papel importante en el desarrollo de los vertebrados.

Debido a su carácter hidrofóbico, las hormonas esteroideas pueden entrar en las células por difusión a través de la membrana plasmática. En el interior de la célula, los corticoesteroides, la hormona tiroidea, la vitamina D_3 y el ácido retinoico se unen a receptores intracelulares expresados por las células sensibles a hormonas. Estos receptores, que son miembros de una familia de proteínas denominada **superfamilia de los receptores de esteroides**, son factores de transcripción que contienen dominios similares implicados en la unión al ligando, en la unión al ADN y en la activación de la transcripción. La unión al ligando regula su función como activadores o represores de sus genes diana, por lo que las hormonas esteroideas y moléculas relacionadas son reguladores directos de la expresión génica.

La unión al ligando tiene efectos distintos según los diferentes receptores. Algunos miembros de la superfamilia de los receptores de esteroides son inactivos en ausencia de hormonas. Por ejemplo, el receptor de glucocorticoides está unido a chaperonas Hsp90 en ausencia de la hormona (Fig. 15.3).

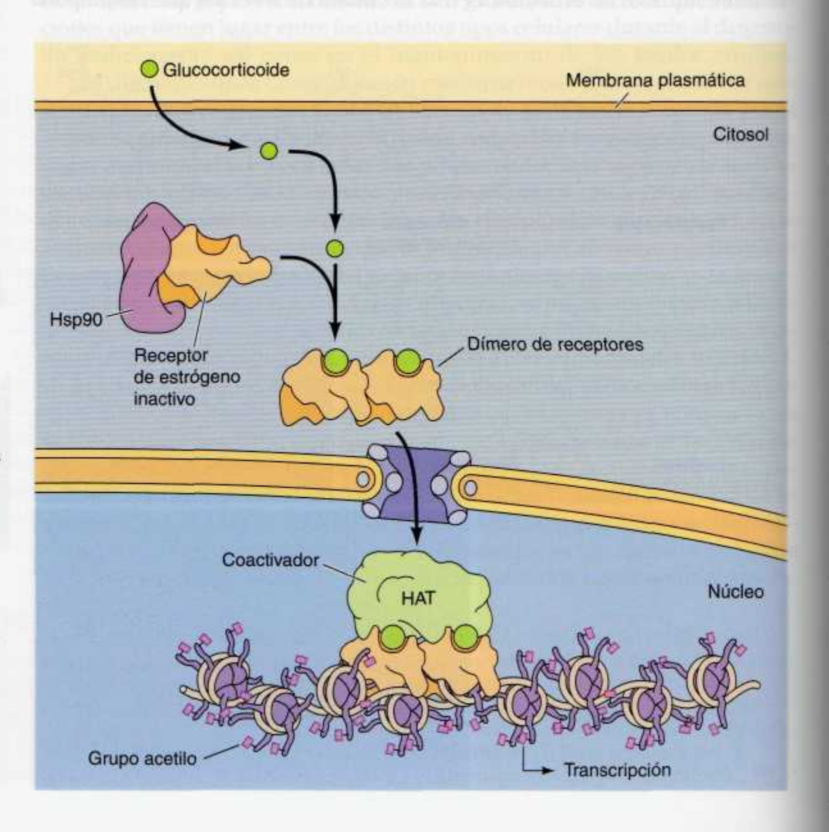


Figura 15.3 Acción de los glucocorticoides. Los glucocorticoides se difunden a través de la membrana plasmática y se unen al receptor de glucocorticoides. En ausencia de su ligando, el receptor se une a Hsp90 en el citoplasma. La unión de una molécula de glucocorticoide desplaza a Hsp90 del receptor y permite la formación de dímeros de receptores. Los receptores activados se traslocan al núcleo, se unen al ADN y se asocian a factores coactivadores con actividad de histona acetiltransferasa (HAT) para estimular la transcripción de los genes diana.

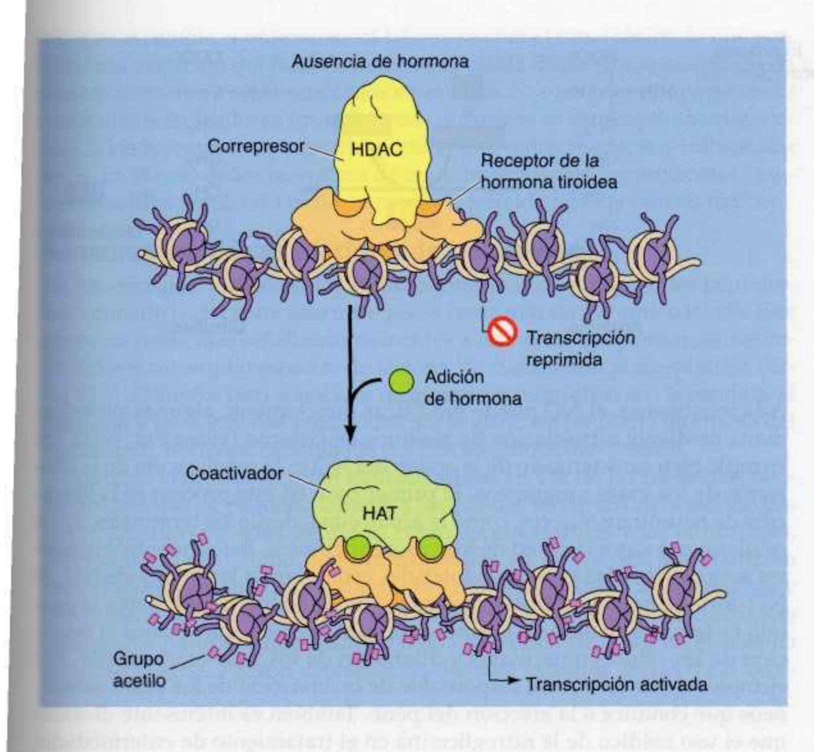


Figura 15.4 Regulación génica mediada por el receptor de la hormona tiroidea. El receptor de la hormona tiroidea se une al ADN tanto en ausencia como en presencia de la hormona. Sin embargo, la unión de la hormona cambia la función del receptor, de represor a activador de la transcripción de los genes diana. En ausencia de la hormona, el receptor se asocia con correpresores que poseen actividad histona deacetilasa (HDAC). En presencia de la hormona, el receptor se asocia con coactivadores que poseen actividad histona acetiltransferasa (HAT).

La unión del glucocorticoide induce un cambio conformacional en el receptor, desplazando a Hsp90 y dando lugar a la formación de dímeros de receptores que se unen a las secuencias reguladoras del ADN y activan la transcripción de los genes diana. En otros casos, el receptor se une al ADN tanto en presencia como en ausencia de la hormona, pero la unión de la hormona modifica la actividad del receptor como molécula reguladora de la transcripción. Por ejemplo, en ausencia de la hormona, el receptor de la hormona tiroidea está asociado con un complejo correpresor y reprime la transcripción de sus genes diana (Fig. 15.4). La unión de la hormona induce un cambio conformacional que resulta en la interacción del receptor con coactivadores en lugar de correpresores, desencadenando la activación transcripcional de los genes inducibles por la hormona tiroidea.

Óxido nítrico y monóxido de carbono

El gas sencillo óxido nítrico (NO) es una molécula señalizadora paracrina fundamental en los sistemas nervioso, inmune y circulatorio. Al igual que las hormonas esteroideas, el NO es capaz de difundir directamente a través de la membrana plasmática de sus células diana. Sin embargo, el fundamento molecular de la acción del NO es diferente al de la acción de las hormonas esteroideas; en vez de unirse a un receptor que regule la transcripción, el NO altera la actividad de enzimas diana intracelulares.

El óxido nítrico se sintetiza a partir del aminoácido arginina mediante la enzima óxido nítrico sintasa (Fig. 15.5). Una vez sintetizado, el NO difunde fuera de la célula y puede actuar localmente afectando a células próximas. Su acción se restringe a estos efectos locales ya que el NO es extremadamente inestable, con una vida media de sólo unos pocos segundos. La principal diana intracelular del NO es la guanilil ciclasa. El NO se une a un grupo hemo del centro activo de esta enzima, estimulando la síntesis del segundo mensajero GMP cíclico (analizado más adelante en este capítulo).

Figura 15.5 Síntesis del óxido nítrico. El enzima óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la formación de óxido nítrico a partir de arginina.

Arginina $\xrightarrow[NOS]{O_2 + NADPH \rightarrow NADP^+}$ Citrulina + NO (Óxido nítrico)

Adicionalmente, el NO puede modificar directamente algunas proteínas diana mediante nitrosilación de residuos de cisterna (véase Fig. 8.41). Un ejemplo bien caracterizado de la acción del NO es la señalización de la dilatación de los vasos sanguíneos. El primer paso en este proceso es la liberación de neurotransmisores, como la acetilcolina, desde los terminales de las células nerviosas a la pared de los vasos sanguíneos. Estos neurotransmisores actúan sobre las células endoteliales estimulando la síntesis de NO. El NO difunde hasta las células vecinas del músculo liso donde activa la guanilil ciclasa, resultando en la síntesis de GMP cíclico, que induce la relajación de las células musculares y dilatación de los vasos sanguíneos. Por ejemplo, el NO es la señal responsable de la dilatación de los vasos sanguíneos que conduce a la erección del pene. También es interesante destacar que el uso médico de la nitroglicerina en el tratamiento de enfermedades cardíacas está basado en su conversión a NO, el cual dilata los vasos sanguíneos coronarios incrementando el flujo sanguíneo al corazón.

Otro gas sencillo, el monóxido de carbono (CO), también funciona como una molécula señalizadora en el sistema nervioso. El CO está íntimamente relacionado con el NO y parece que actúa de igual manera como neurotransmisor que como mediador de la vasodilatación. La síntesis del CO en células cerebrales, al igual que la del NO, es estimulada por neurotransmisores. Asimismo, el CO estimula a la guanilato ciclasa, la cual parece ser la principal diana fisiológica de la señalización mediante CO.

Neurotransmisores

Los **neurotransmisores** llevan las señales entre las neuronas o desde las neuronas a algún otro tipo de célula diana (como las células musculares). Son un grupo diverso de moléculas pequeñas, hidrofílicas que incluye a la acetilcolina, dopamina, epinefrina (adrenalina), serotonina, histamina, glutamato, glicina, y ácido γ-amino butírico (GABA) (Fig. 15.6). La señal de liberación de los neurotransmisores es la llegada de un potencial de acción al terminal de la neurona (véase Fig. 13.24). Una vez liberados, los neurotransmisores difunden a través del espacio sináptico y se unen a los receptores de superficie de la célula diana. Hay que destacar que algunos neurotransmisores también actúan como hormonas. Por ejemplo, la epinefrina funciona como un neurotransmisor y como una hormona producida por la glándula suprarrenal para activar la hidrólisis del glucógeno en las células musculares.

Debido a que los neurotransmisores son hidrofílicos, no son capaces de atravesar la membrana plasmática de las células diana. Por ello, y a diferencia de las hormonas esteroideas y el NO o el CO, el mecanismo de actuación de los neurotransmisores es mediante la unión a receptores celulares de superficie. Muchos receptores de neurotransmisores son canales iónicos regulados por ligando, como el receptor de acetilcolina, mencionado en el Capítulo 13 (véase Fig. 13.25). El neurotransmisor que se une a estos receptores

Acetilcolina: $CH_3-C(=O)-O-CH_2-CH_2-N^+-(CH_3)_3$

Glicina: $H_3\overset{+}{N}-CH_2-C(=O)-O^-$

Glutamato: $H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-C(=O)-O^-$

Dopamina: $(HO)_2C_6H_3-CH_2-CH_2-NH_3^+$

Norepinefrina: $(HO)_2C_6H_3-CH(OH)-CH_2-NH_3^+$

Epinefrina: $(HO)_2C_6H_3-CH(OH)-CH_2-NH_2^+-CH_3$

Serotonina: HO-indol-$CH_2-CH_2-NH_3^+$

Histamina: imidazol-$CH_2-CH_2-NH_3^+$

Ácido γ-aminobutírico (GABA): $H_3\overset{+}{N}-CH_2-CH_2-CH_2-C(=O)-O^-$

Figura 15.6 Estructura de neurotransmisores representativos. Los neurotransmisores son moléculas hidrofílicas que se unen a receptores celulares de superficie.

induce un cambio conformacional tal que se abre el canal iónico, lo que permite una variación del flujo de iones en la célula diana. Otros receptores de neurotransmisores están acoplados a proteínas G —un grupo importante de moléculas señalizadoras (tratadas posteriormente en este capítulo) que acoplan a los receptores de superficie celular a diversas respuestas intracelulares—. En el caso de los receptores de neurotransmisores, las proteínas G asociadas actúan regulando indirectamente la actividad de los canales iónicos.

Hormonas peptídicas y factores de crecimiento

En los animales, las moléculas señalizadoras más diversas son los péptidos, cuyo *tamaño oscila entre sólo unos pocos hasta más de 100 aminoácidos*. Este grupo de moléculas señalizadoras incluye a las hormonas peptídicas, neuropéptidos y un amplio espectro de factores de crecimiento polipeptídicos (Tabla 15.1). Ejemplos bien conocidos de **hormonas peptídicas** son la insulina, el glucagón y las hormonas producidas por la glándula pituitaria (hormona del crecimiento, hormona estimulante del folículo, prolactina y otras).

Algunas neuronas secretan **neuropéptidos** en vez de las moléculas neurotransmisoras de pequeño tamaño a las que nos referimos en la sección anterior. Algunos de estos péptidos, como las **encefalinas** y las **endorfinas**, funcionan no sólo como neurotransmisores en la sinapsis sino también como **neurohormonas** que actúan sobre células alejadas. Las encefalinas y *las endorfinas se han estudiado ampliamente debido a su actividad como* analgésicos naturales que disminuyen la respuesta de dolor en el sistema nervioso central. Fueron descubiertas durante estudios acerca de la adic-

Tabla 15.1 Hormonas peptídicas, neuropéptidos y factores de crecimiento representativos

Molécula señal	Tamaño[a]	Función[b]
Hormonas peptídicas		
Insulina	A = 21, B = 30	Regulación de la absorción de la glucosa; estimula la proliferación celular
Glucagón	29	Estimula la síntesis de glucosa
Hormona del crecimiento	191	Estimula el crecimiento
Hormona estimulante del folículo (FSH)	α = 92, β = 118	Estimula el desarrollo de los oocitos y de los folículos ováricos
Prolactina	198	Estimula la producción de leche
Neuropéptidos y neurohormonas		
Sustancia P	11	Transmisión sináptica sensorial
Oxitocina	9	Estimula la contracción del músculo liso
Vasopresina	9	Estimula la reabsorción de agua en el riñón
Encefalinas	5	Analgésica
β-Endorfina	31	Analgésica
Factores de crecimiento		
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	118	Supervivencia y diferenciación neuronal
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	53	Proliferación de muchos tipos celulares
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)	A = 125, B = 109	Proliferación de fibroblastos y de otros tipos celulares
Interleuquina-2	133	Proliferación de linfocitos T
Eritropoyetina	166	*Desarrollo de glóbulos rojos*

[a] El tamaño se expresa en número de aminoácidos. Algunas hormonas y factores de crecimiento están constituidos por dos cadenas polipeptídicas diferentes, las cuales se designan A y B o α y β.

[b] La mayoría de estas hormonas y factores de crecimiento ejercen otras funciones además de las arriba indicadas.

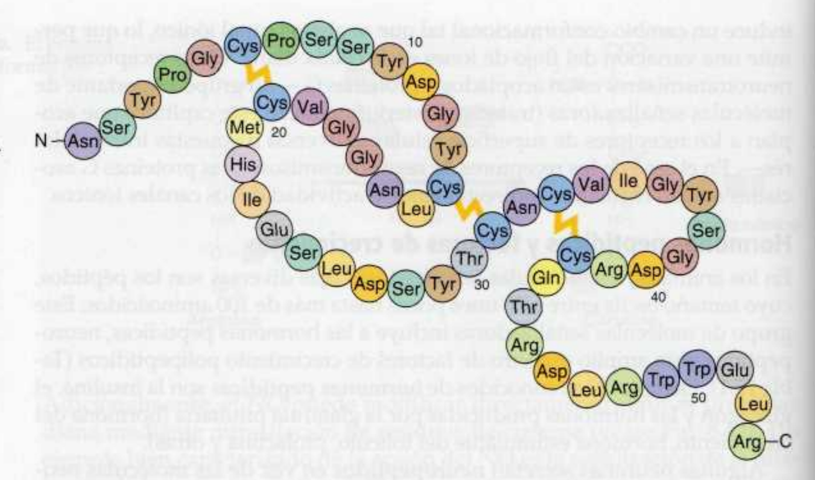


Figura 15.7 Estructura del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El EGF es una única cadena polipeptídica constituida por 53 aminoácidos. Se indican los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína. (A partir de G. Carpenter y S. Cohen, 1979. *Ann. Rev. Biochem.* 48:193.)

ción a las drogas, y son compuestos producidos por el propio organismo que se unen a los mismos receptores de superficie de las células cerebrales a los que se une la morfina.

Los **factores de crecimiento** polipeptídicos incluyen una amplia gama de moléculas señalizadoras que controlan el crecimiento y la diferenciación de las células animales. El primero de estos factores (el **factor de crecimiento nervioso**, o **NGF**) fue descubierto por Rita Levi-Montalcini en los años 50. El NGF pertenece a una familia de polipéptidos (denominados **neurotrofinas**) que regulan el desarrollo y la supervivencia de las neuronas. Durante el transcurso de experimentos con el NGF, Stanley Cohen descubrió casualmente un factor diferente (denominado **factor de crecimiento epidérmico**, o **EGF**) que estimula la proliferación celular. El EGF, un polipéptido de 53 aminoácidos (Fig. 15.7), se considera el prototipo de una amplia serie de factores de crecimiento que desempeñan un papel fundamental en el control de la proliferación celular, tanto durante el desarrollo embrionario como en el organismo adulto.

Un buen ejemplo de la acción de los factores de crecimiento lo proporciona la actividad del **factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)** en la cicatrización de las heridas. El PDGF se almacena en las plaquetas y se libera durante la coagulación sanguínea en el lugar de la herida. Entonces, estimula la proliferación de fibroblastos en la proximidad del coágulo, lo que contribuye a la regeneración del tejido dañado. Por otra parte, el PDGF desempeña papeles clave en el desarrollo de diversos tejidos embrionarios. Los miembros de otro gran grupo de factores de crecimiento polipeptídicos (denominados **citoquinas**) regulan el desarrollo y la diferenciación de las células sanguíneas y controlan la actividad de los linfocitos durante la respuesta inmune. Otros factores de crecimiento polipeptídicos (**factores de crecimiento anclados a la membrana**) permanecen asociados a la membrana plasmática en vez de ser secretados al fluido extracelular; por tanto, actúan específicamente como moléculas señalizadoras en las interacciones directas célula-célula.

Las hormonas peptídicas, los neuropéptidos y los factores de crecimiento no pueden atravesar la membrana plasmática de las células diana, por lo que actúan mediante la unión a receptores de superficie celulares, lo que se tratará posteriormente en este capítulo. Tal y como cabría esperar del papel crucial que desempeñan los factores de crecimiento polipeptídicos en el control de la proliferación celular, las alteraciones en la señalización mediada por factores de crecimiento son la fuente de multitud de enfermedades, incluyendo muchos tipos de cáncer. Por ejemplo, la expresión alterada del

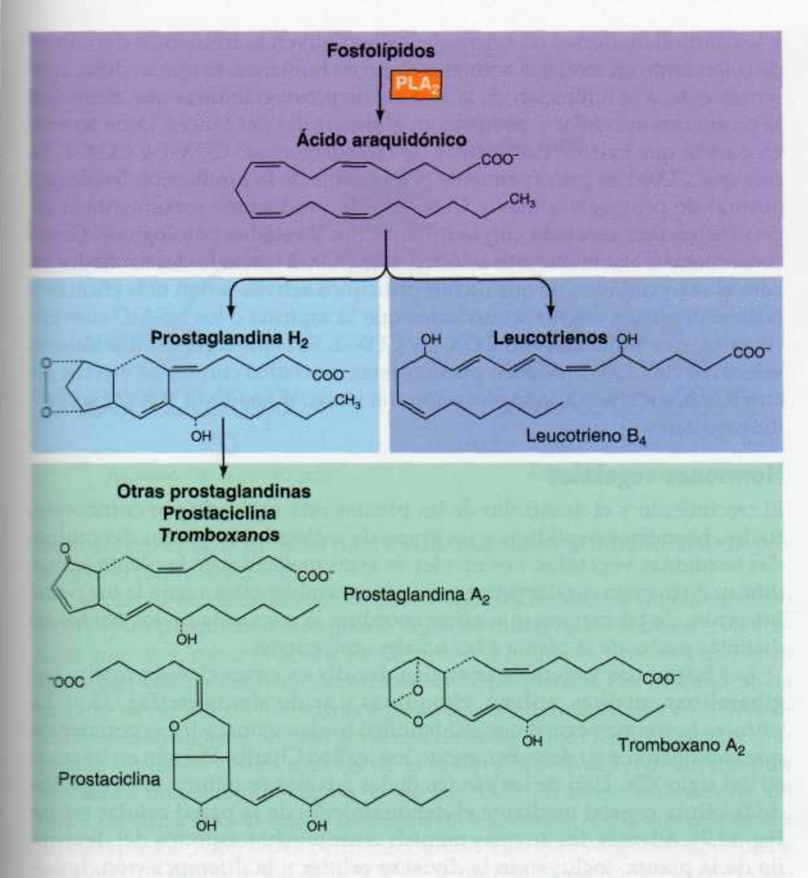


Figura 15.8 Síntesis y estructura de los eicosanoides. Los eicosanoides incluyen a las prostaglandinas, la prostaciclina, los tromboxanos y los leucotrienos. Son sintetizados a partir del ácido araquidónico, el cual se forma a partir de la hidrólisis de fosfolípidos catalizada por la fosfolipasa A_2 (PLA_2). El ácido araquidónico puede, a partir de aquí, seguir dos caminos metabólicos alternativos: una vía lleva a la síntesis de las prostaglandinas, la prostaciclina y los tromboxanos, mientras que la otra conduce a la síntesis de los leucotrienos.

receptor de EGF es un factor importante para el desarrollo de diversos cánceres humanos, e inhibidores del receptor de EGF parecen ser agentes prometedores para el tratamiento del cáncer (véase Cap. 18).

Eicosanoides

Muchos tipos de lípidos sirven como moléculas señalizadoras que, a diferencia de las hormonas esteroideas, actúan mediante la unión a receptores de superficie celular. Los más importantes de este tipo de moléculas son los miembros de una clase de lípidos denominados **eicosanoides**, que incluyen a las **prostaglandinas**, la **prostaciclina**, los **tromboxanos** y los **leucotrienos** (Fig. 15.8). Los eicosanoides se hidrolizan rápidamente, por lo que actúan localmente en vías de señalización autocrinas o paracrinas. Estimulan una gran diversidad de respuestas en las células diana, como por ejemplo la agregación plaquetaria, la inflamación y la contracción del músculo liso.

Todos los eicosanoides se sintetizan a partir del ácido araquidónico, que se forma a partir de los fosfolípidos. El primer paso en la vía que conduce a la síntesis tanto de prostaglandinas como de tromboxanos es la transformación del ácido araquidónico en la prostaglandina H_2. Es de destacar que la enzima que cataliza esta reacción (la ciclooxigenasa) es la diana de la aspirina y de otros medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID). Mediante la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas, la aspirina reduce la inflamación y el dolor. Mediante la inhibición de la síntesis de los tromboxanos, la aspirina reduce la agregación plaquetaria y la coagulación. Debido a esta acción, se suelen recetar pequeñas dosis diarias de aspirina para prevenir los accidentes cerebrovasculares. Además, se ha descubierto que la aspirina

y los antiinflamatorios no esteroideos disminuyen la frecuencia del cáncer de colon tanto en modelos animales como en humanos, lo que se debe, aparentemente, a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas que estimulan la proliferación celular y promueven el desarrollo del cáncer. Debe tenerse en cuenta que existen dos formas de ciclooxigenasa: COX-1 y COX-2. Se cree que COX-1 es principalmente responsable de la producción fisiológica normal de prostaglandinas y COX-2 de la producción incrementada de prostaglandina asociada con la inflamación y estados patológicos. Como consecuencia, los inhibidores selectivos de COX-2 han sido desarrollados en base al razonamiento de que dichos principios activos serían más eficaces y poseerían menos efectos secundarios que la aspirina o los NSAID convencionales, que inhiben tanto COX-1 y COX-2. Sin embargo, los inhibidores selectivos de COX-2 también pueden estar asociados con serios efectos secundarios, incluyendo una elevación del riesgo de padecer patologías cardiovasculares.

Hormonas vegetales

El crecimiento y el desarrollo de las plantas está regulado por corticoesteroides, hormonas peptídicas y un grupo de moléculas pequeñas denominadas **hormonas vegetales**. Los niveles de estas moléculas en la planta se modifican de manera característica por factores ambientales, como la luz o una infección, de tal manera que así se coordina la respuesta de los tejidos en distintas partes de la planta a las señales ambientales.

Las hormonas vegetales se suelen dividir en cinco clases principales: **giberelinas**, **auxinas**, **etileno**, **citoquinas** y **ácido abscísico** (Fig. 15.9). La primera hormona vegetal que se identificó fue la auxina, y los experimentos que condujeron a su descubrimiento los realizó Charles Darwin en los años 80 del siglo XIX. Uno de los efectos de las auxinas es inducir la elongación de la célula vegetal mediante el debilitamiento de la pared celular (véase Fig. 14.7). Además, las auxinas regulan otros muchos aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la división celular y la diferenciación. Igualmente, las otras hormonas vegetales tienen diversos efectos sobre sus tejidos diana, que incluyen la elongación del tallo (giberelinas), la maduración

Ácido giberélico (una giberelina)

Ácido indol-3-acético (una auxina)

Etileno

Zeatina (una citoquinina)

Ácido abscísico

Figura 15.9 Estructura de las hormonas vegetales.

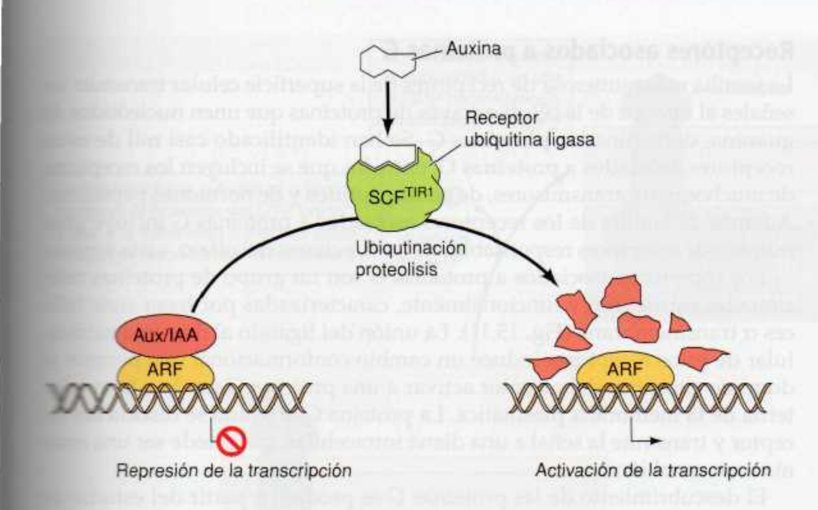


Figura 15.10 Señalización mediada por auxina. En ausencia de auxina, un factor de transcripción (ARF) asociado a un correpresor (Aux/IAA) se une a los promotores de los genes regulados por auxina. La auxina se une a un receptor con actividad de ubiquitina ligasa (SCF^{TIR1}), lo que induce la ubiquitinación y la proteolisis de Aux/IAA, de modo que ARF puede activar la transcripción de los genes inducidos por auxina.

del fruto (etileno), la división celular (citoquininas) y la inhibición de la germinación (ácido abscísico).

Las vías de señalización activadas por algunas hormonas vegetales, como etileno y las citoquinas, emplean mecanismos conservados también en las células animales, como la activación de proteína quinasas, mientras que otras estimulan vías de señalización exclusivas de las plantas. Por ejemplo, se ha logrado identificar un nuevo mecanismo de acción de la auxina en *Arabidopsis thaliana* en algunos análisis genéticos recientes (Fig. 15.10). La auxina controla la expresión génica a través de la unión y la activación de un receptor asociado a una ubiquitina ligasa (véase Fig. 8.43). En ausencia de auxina, un factor de transcripción (factor de respuesta a auxina o ARF), que se asocia a un correpresor (Aux/IAA), permanece unido a los genes regulados por dicha hormona. La estimulación de la SCF^{TIR1} ubiquitina ligasa por acción de la auxina induce la degradación del correpresor Aux/IAA y posibilita la activación de la transcripción de los genes diana del factor de respuesta a auxina.

Funciones de los receptores de la superficie celular

Como ya se ha visto, la mayoría de los ligandos responsables de la señalización célula-célula (incluidos los neurotransmisores, las hormonas peptídicas y los factores de crecimiento) se unen a receptores de la superficie de las células diana. Por tanto, un reto fundamental en la comprensión de la señalización célula-célula es desenmascarar los mecanismos mediante los que los receptores celulares de superficie transmiten las señales iniciadas por la unión del ligando. Como ya se describió en el Capítulo 13, algunos receptores de los neurotransmisores son canales iónicos regulados por ligando que controlan de manera directa el flujo de iones a través de la membrana plasmática. En cambio, otros receptores de superficie, entre los que se encuentran los receptores de las hormonas peptídicas y los de los factores de crecimiento, actúan regulando la actividad de proteínas intracelulares. Estas proteínas, a su vez, transmiten las señales desde el receptor a un conjunto de dianas intracelulares adicionales, que suelen ser frecuentemente factores de transcripción. Así, la unión a un receptor en la superficie de la célula genera una cascada de reacciones intracelulares, que acaban alcanzando al núcleo celular y que dan lugar a alteraciones programadas de la expresión génica. Aquí se tratarán las funciones de las principales clases de receptores de superficie, mientras que en la siguiente sección de este capítulo se tratarán las rutas de señalización intracelular a partir de los receptores.

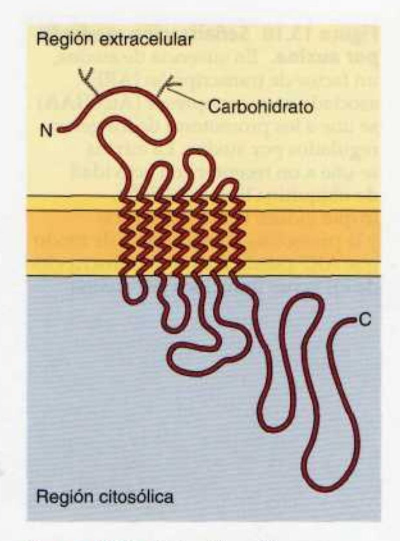


Figura 15.11 Estructura de un receptor asociado a proteína G. Los receptores asociados a las proteínas G se caracterizan por tener siete hélices α transmembrana.

■ **Los receptores acoplados a proteínas G responsables de nuestro sentido del olfato (receptores odorantes) están codificados por unos mil genes en los genomas de mamífero.**

Receptores asociados a proteínas G

La familia más numerosa de receptores de la superficie celular transmite las señales al interior de la célula a través de proteínas que unen nucleótidos de guanina, denominadas **proteínas G**. Se han identificado casi mil de estos **receptores asociados a proteínas G**, entre los que se incluyen los receptores de muchos neurotransmisores, de neuropéptidos y de hormonas peptídicas. Además, la familia de los receptores asociados a proteínas G incluye gran número de receptores responsables de las funciones del olfato, vista y gusto.

Los receptores asociados a proteínas G son un grupo de proteínas relacionadas estructural y funcionalmente, caracterizadas por tener siete hélices α transmembrana (Fig. 15.11). La unión del ligando al dominio extracelular de estos receptores induce un cambio conformacional que permite al dominio citosólico del receptor activar a una proteína G unida a la cara interna de la membrana plasmática. La proteína G activada se disocia del receptor y transmite la señal a una diana intracelular, que puede ser una enzima o un canal iónico.

El descubrimiento de las proteínas G se produjo a partir del estudio de hormonas (como la epinefrina) que regulan la síntesis del AMP cíclico (AMPc) en las células diana. Como se comentará posteriormente en este capítulo, el AMPc es un segundo mensajero importante que actúa como mediador de la respuesta celular a diversas hormonas. En los años 70, Martin Rodbell y cols. realizaron el descubrimiento clave de que el GTP es necesario para la estimulación hormonal de la adenilato ciclasa (la enzima responsable de la formación de AMPc). Esto condujo a su vez al descubrimiento de que una proteína que une nucleótidos de guanina (denominada proteína G) era un intermediario de la activación de la adenilato ciclasa (Fig. 15.12). Desde entonces, se ha encontrado un vasto conjunto de proteínas G que actúan a modo de interruptores fisiológicos, regulando la actividad de diversas dianas intracelulares en respuesta a señales extracelulares.

Las proteínas G están constituidas por tres subunidades, designadas α, β y γ (Fig. 15.13). Frecuentemente se les denomina **proteínas G heterotriméricas** para distinguirlas de otras proteínas que unen nucleótidos de guanina, como la proteína Ras, a la que nos referiremos más adelante. La subunidad α se une a los nucleótidos de guanina, que regulan la actividad de la proteína G. En el estado inactivo, α se une al GDP formando un complejo con β y γ. La unión de la hormona induce un cambio conformacional tal en el receptor que el dominio citosólico de éste interacciona con la proteína G estimulando la liberación del GDP y su intercambio por GTP. La subunidad α unida al GTP, ahora activada, se disocia de β y γ, que permanecen unidas constituyendo un complejo βγ. Tanto la subunidad α unida al GTP activa

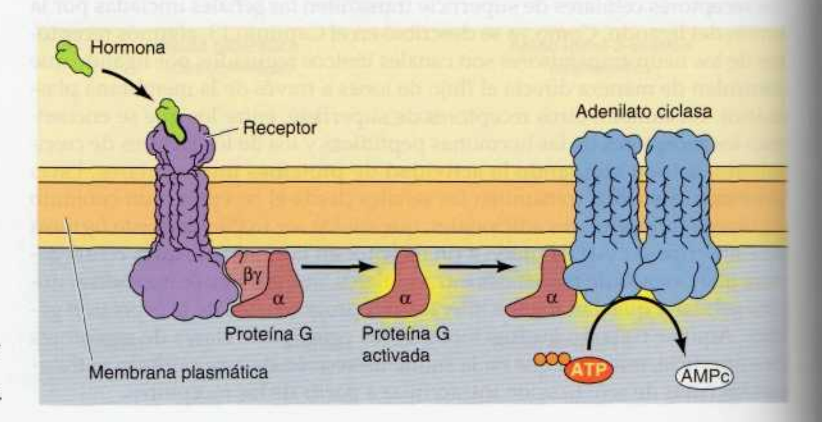


Figura 15.12 Activación hormonal de la adenilato ciclasa. La unión de la hormona induce la interacción del receptor con la proteína G. Entonces, la subunidad α activada de la proteína G se disocia del receptor y estimula a la adenilato ciclasa, que cataliza la conversión del ATP a AMPc.

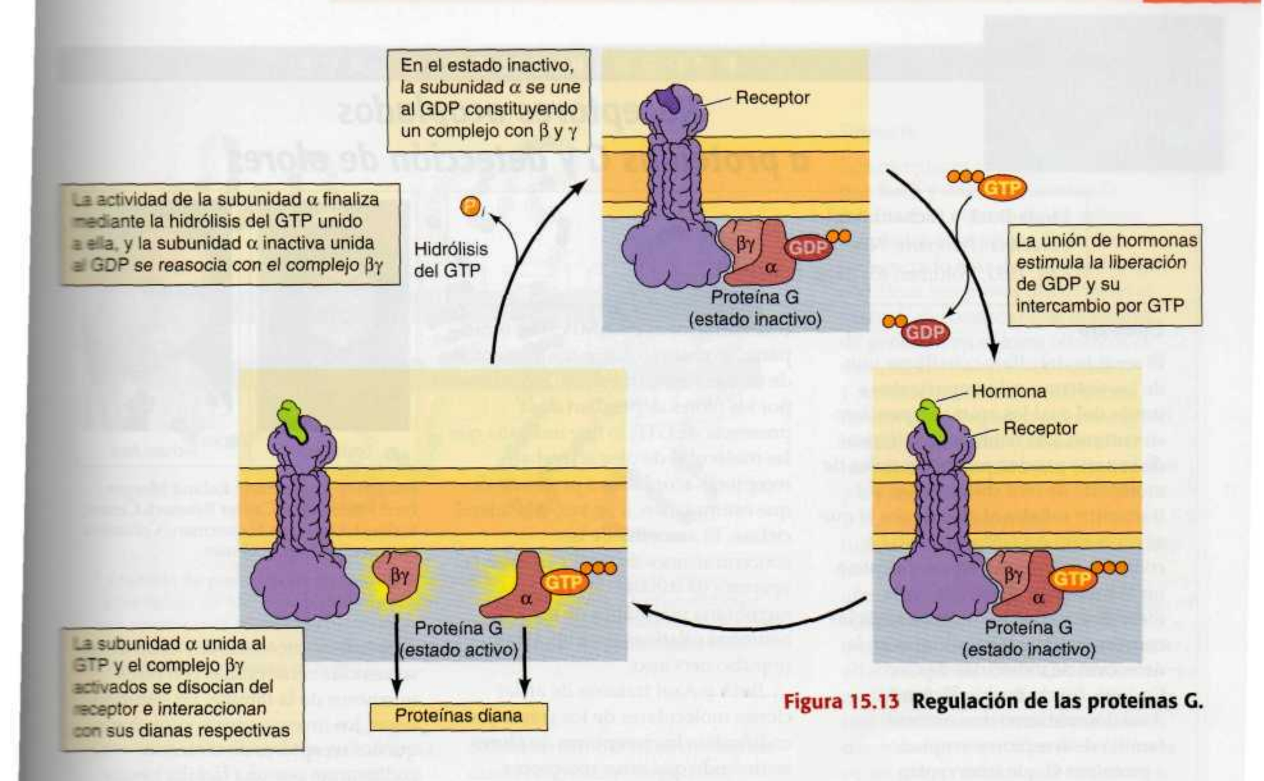


Figura 15.13 Regulación de las proteínas G.

como el complejo βγ, interaccionan con sus dianas para dar lugar a una respuesta intracelular. La subunidad α se inactiva por la hidrólisis del GTP unido a ella, de tal manera que la subunidad α inactiva (ahora unida a GDP) se reasocia con el complejo βγ, quedando así listo para el comienzo de un nuevo ciclo.

El genoma humano codifica 21 subunidades α, 6 subunidades β y 12 subunidades γ diferentes. Proteínas G distintas se asocian con receptores distintos, de tal manera que esta panoplia de proteínas G acopla los receptores a diferentes dianas intracelulares. Por ejemplo, la proteína G asociada al receptor de la epinefrina se denomina G_S porque su subunidad α estimula a la adenilato ciclasa (véase Fig. 15.12). Las subunidades α y βγ de otras proteínas G actúan, sin embargo, inhibiendo a la adenilato ciclasa o regulando la actividad de otras enzimas diana.

Además de regular enzimas diana, tanto la subunidad α como las βγ de algunas proteínas G regulan directamente canales iónicos. Un buen ejemplo lo proporciona el efecto del neurotransmisor acetilcolina en el músculo cardíaco, que es diferente al ejercido en los nervios o en el músculo esquelético. El receptor de la acetilcolina en las células nerviosas o del músculo esquelético es un canal iónico regulado por ligando (véase Fig. 13.25). Las células del músculo cardíaco tienen un receptor de acetilcolina diferente, asociado a proteína G. Esta proteína G se denomina G_i porque su subunidad α *i*nhibe a la adenilato ciclasa. Además, las subunidades β y γ de G_i actúan directamente sobre los canales de K^+ de la membrana plasmática causando su apertura, dando como resultado una contracción más lenta del músculo cardíaco.

Receptores proteína-tirosina quinasa

A diferencia de los receptores asociados a proteínas G, otros receptores de la superficie celular se encuentran directamente acoplados a enzimas intracelu-

15.2 **Animación web**

Transducción de la señal

La mayor familia de receptores de la superficie celular transmite señales al interior celular activando a las proteínas G, que unen GTP y a continuación activan a las proteínas efectoras.



EXPERIMENTO CLAVE

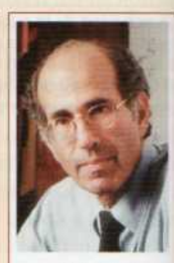
Receptores acoplados a proteínas G y detección de olores

Linda Buck y Richard Axel
Columbia University, New York
Cell, 1991, Volumen 65, págs. 175-187





Linda Buck



Richard Axel

Imágenes: Linda Buck: Roland Morgan/ Fred Hutchinson Cancer Research Center; Richard Axel: Don Hamerman/Columbia University Medical Center.

Contexto

El sentido del olfato constituye uno de los sistemas más importantes a través del cual los animales perciben su entorno. Las neuronas periféricas de la nariz pueden reconocer miles de moléculas de olor diferentes y transmitir señales al cerebro, en el que se procesará esta información. La comprensión del sentido del olfato a nivel molecular dependía de la identificación de los receptores de las neuronas olfativas implicadas en la detección de moléculas de olor. En 1991, Linda Buck y Richard Axel descubrieron una extensa familia de receptores acoplados a proteínas G que intervenían en la detección y el reconocimiento de olores.

Anteriormente se había determinado que las moléculas de olor eran reconocidas por receptores localizados en los cilios de las neuronas olfativas. Lo que es más importante, se había demostrado que la exposición de cilios aislados procedentes de neuronas olfativas de rata a un amplio abanico de olores se asociaba a la estimulación de la adenil ciclasa y el aumento de las concentraciones de AMPc. Por otra parte, se observó que estos aumentos de dichas concentraciones inducidos por los olores dependían de la presencia de GTP, lo que indicaba que las moléculas de olor activaban receptores acoplados a proteínas G que estimulaban, a su vez, a la adenil ciclasa. El aumento de las concentraciones de AMPc inducía la apertura de canales de Na^+ en la membrana plasmática de las neuronas olfativas para iniciar un impulso nervioso.

Buck y Axel trataron de aislar clones moleculares de los genes que codificaban los receptores de olores asumiendo que estos receptores pertenecerían a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y compartían ciertas secuencias conservadas con otros componentes de dicha familia.

Experimento

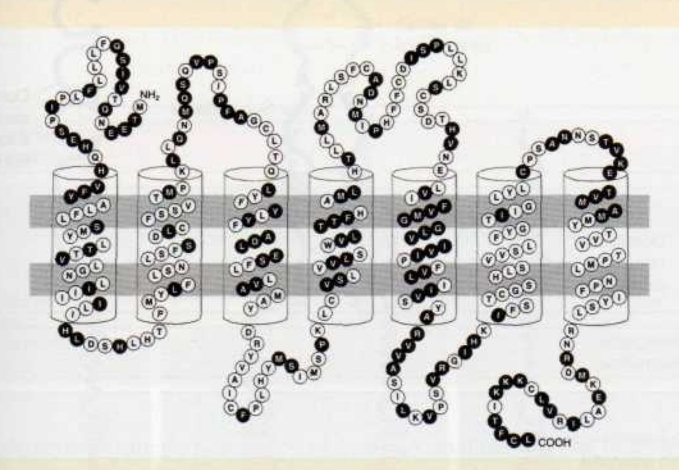
El abordaje que Buck y Axel tomaron para clonar los genes de los receptores de olores estaba basado en tres suposiciones. En primer lugar, que los receptores de olores eran miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y compartían secuencias conservadas con otros miembros de la familia. En segundo lugar, los investigadores supusieron que los receptores de olores se codificarían por una familia génica amplia, lo que parece necesario para el reconocimiento de un elevadísimo número de estímulos olfativos. Finalmente, consideraron los receptores se expresarían únicamente en las neuronas olfativas.

Por tanto, utilizaron cebadores oligonucleotídicos que correspondían a secuencias conservadas de receptores acoplados a proteínas G conocidos con el fin de amplificar los ARNm de las neuronas olfativas por medio de la transcriptasa inversa seguida de PCR

lares. La familia más grande de estos receptores acoplados a enzimas son los **receptores proteína-tirosina quinasas**, los cuales fosforilan las proteínas sustrato en los residuos de tirosina. Esta familia incluye a los receptores para la mayoría de los factores de crecimiento polipeptídicos, por lo que la fosforilación de las tirosinas de las proteínas han sido estudiadas fundamentalmente como un mecanismo de señalización involucrado en el control del crecimiento y de la diferenciación de las células animales. Así, la primera proteína-tirosina quinasa fue descubierta en trabajos de investigación sobre la proteína oncogénica del virus del sarcoma de Rous (véase Experimento Clave del Cap. 8). Igualmente, Stanley Cohen y cols. encontraron que el receptor del EGF actuaba como una proteína-tirosina quinasa, estableciendo así que la fosforilación de las tirosinas de la proteína era un mecanismo de señalización esencial en la respuesta celular a la estimulación por factores de crecimiento.

El genoma codifica 59 receptores proteína-tirosina quinasas, incluyendo los receptores para el EGF, NGF, PDGF, la insulina y muchos otros factores

EXPERIMENTO CLAVE



La familia de proteínas de receptores olfativos. La proteína codificada por uno de los clones de ADNc de receptores olfativos posee siete hélices α transmembrana que atraviesan la membrana plasmática. Los aminoácidos conservados en otros clones de receptores olfativos se muestran en blanco, mientras que los aminoácidos más variables se representan en negro.

(*reacción en cadena de la polimerasa*) (véase Fig. 4.23). Estos experimentos dieron como fruto un gran número de fragmentos de PCR, lo que confirmaba la expresión de una familia grande de genes para receptores acoplados a proteínas G en las neuronas olfativas. Los fragmentos amplificados se clonaron en vectores plasmídicos y se aislaron 18 clones diferentes de ADNc para su caracterización ulterior. Al utilizarlos como sondas en blots Northern, se constató la expresión de ARNm homólogos en las neuronas olfativas, pero no en otros tipos celulares, como células cerebrales, cardíacas, renales, hepáticas, pulmonares, ováricas, retinianas ni esplénicas. Asimismo, la secuenciación nucleotídica de 10 clones completos reveló que codificaban una familia diferente de proteínas con siete hélices α transmembrana típicas de los receptores acoplados a proteínas G (véase figura). Por último, la hibridación de los clones de ADNc al ADN genómico indicó que una amplia familia multigénica formada por cientos de genes codificaba los receptores olfativos.

Impacto

Los receptores olfativos identificados por Buck y Axel representan la familia más extensa de receptores acoplados a proteínas G. Se han secuenciado más de 1.000 genes que codifican receptores olfativos en el ratón. Cabe destacar que la familia de genes de receptores olfativos es menos extensa en el ser humano y se compone de unos 400 genes funcionales, lo que co ncuerda con el menor sentido del olfato en el ser humano en comparación con el perro y los roedores.

La comprensión del funcionamiento del sentido del olfato ha sido posible gracias a la identificación de los receptores olfativos. Cada neurona olfativa expresa solamente un único receptor olfativo, que se une a distintas moléculas de olor, de modo que cada una de ellas es detectada por una *combinación específica de receptores* de un grupo definido de neuronas olfativas, que transmitirán la información captada al cerebro. No obstante, no se conoce aún la red de conexiones nerviosas que conducen la información desde las neuronas olfativas hasta el cerebro, el cual integra estos impulsos nerviosos y los *interpreta como olores específicos*. La identificación de estas redes de conexiones neuronales es objeto de una intensa investigación encaminada a comprender el procesamiento de información en el sistema nervioso.

de crecimiento. Estos receptores comparten una estructura común: un dominio N-terminal extracelular de unión al ligando, una única hélice α transmembrana, y un dominio citosólico C- terminal con actividad proteína-tirosina quinasa (Fig. 15.14). La mayoría de los receptores proteína-tirosina quinasas están constituidos por un único polipéptido, pero el receptor de la insulina y otros receptores relacionados son dímeros constituidos por dos pares de cadenas polipeptídicas. La unión del ligando (p. ej., un factor de crecimiento) al dominio extracelular de estos receptores activa el dominio quinasa citosólico, dando lugar a la fosforilación del propio receptor y de las proteínas diana intracelulares, que propagan la señal iniciada por la unión del factor de crecimiento.

El primer paso del proceso de señalización en la mayoría de los receptores proteína-tirosina quinasas es la dimerización del receptor inducida por ligando (Fig. 15.15). Algunos factores de crecimiento, como el PDGF o el NGF, son dímeros constituidos por dos cadenas polipeptídicas idénticas; es-

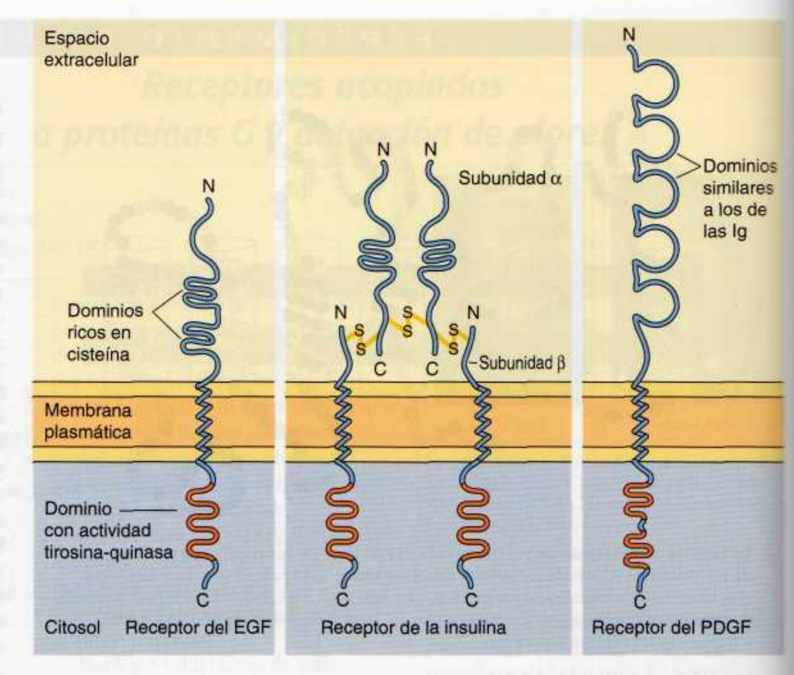
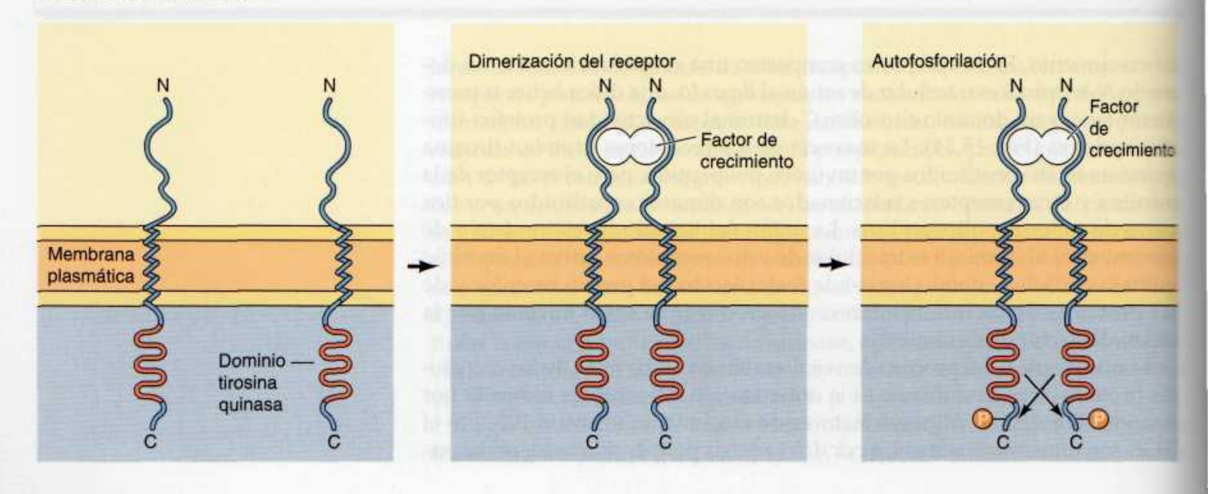


Figura 15.14 Organización de los receptores proteína-tirosina quinasas. Cada receptor está constituido por un dominio N-terminal extracelular de unión al ligando, una única hélice α transmembrana y un domino citosólico C-terminal con actividad proteína-tirosina quinasa. Se muestra la estructura de tres subfamilias distintas de receptores proteína-tirosina quinasas. Tanto el receptor del EGF como el receptor de la insulina tienen dominios extracelulares ricos en cisteína, mientras que el receptor del PDGF tiene dominios semejantes a los de las inmunoglobulinas (Ig). Del receptor del PDGF, merece la pena señalar que su dominio quinasa está interrumpido por un inserto de unos 100 aminoácidos que no están relacionados con los aminoácidos habitualmente encontrados en los dominios catalíticos de las proteína-tirosina quinasas. La peculiaridad del receptor de insulina es que es un dímero constituido por dos pares de cadenas polipeptídicas (denominadas α y β).

tos factores de crecimiento inducen la polimerización a través de la unión simultánea a dos moléculas diferentes de receptor. Otros factores de crecimiento (como el EGF) son monómeros pero desencadenan la dimerización de receptores como resultado de la inducción de cambios conformacionales que facilitan las interacciones proteína-proteína entre los polipéptidos de los receptores.

La dimerización inducida por ligando conduce a la **autofosforilación** del receptor ya que las cadenas polipeptídicas del dímero se fosforilan la una a la otra de manera cruzada (véase Fig. 15.15). La autofosforilación desempeña dos papeles fundamentales en la señalización a través de estos receptores. En primer lugar, la fosforilación de los residuos de tirosina del dominio catalítico es un mecanismo de regulación ya que incrementa la actividad proteína quinasa del receptor. En segundo lugar, la fosforilación de los resi-

Figura 15.15 Dimerización y autofosforilación de los receptores proteína-tirosina quinasas. La unión del factor de crecimiento induce la dimerización del receptor, lo que da lugar a la autofosforilación del mismo ya que las dos cadenas polipeptídicas se fosforilan mutuamente.



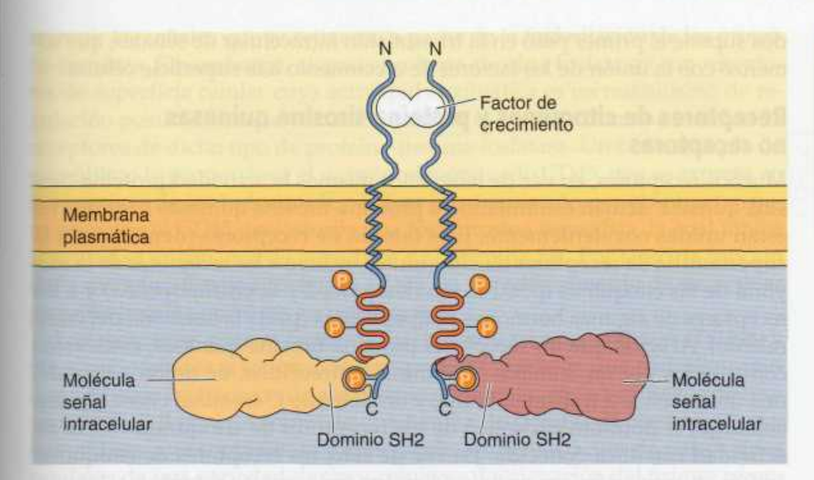


Figura 15.16 Asociación de moléculas señal intracelulares con los receptores proteína-tirosina quinasas. Los dominios SH2 se unen a péptidos específicos que contengan fosfotirosina, de los receptores activados.

duos de tirosina que no pertenecen al dominio catalítico supone la generación de sitios de unión específicos para otras proteínas, a través de las que se transmitirá la señal al interior celular desde los receptores activados.

La asociación de estas moléculas señal intracelulares con los receptores proteína-tirosina quinasas se lleva a cabo a través de un dominio de la proteína que se une a péptidos específicos del receptor que contengan fosfotirosinas (Fig. 15.16). De estos dominios, los mejor conocidos se denominan **dominios SH2** (de *h*omología 2 con *S*rc), ya que fueron identificados por primera vez en las proteína-tirosina quinasas relacionadas con Src, la proteína oncogénica del virus del sarcoma de Rous. Los dominios SH2 se componen de cien aminoácidos aproximadamente, y se unen a cortas secuencias peptídicas específicas que contengan residuos de fosfotirosina (Fig. 15.17). Otras proteínas se unen a los péptidos que contienen residuos de fosfotirosina mediante los **dominios PTB** (del inglés *p*hospho*t*yrosine *b*inding). La asociación de las proteínas con dominios SH2 o PTB, con los receptores proteína-tirosina quinasas activados tiene varios efectos: localiza a estas proteínas en la membrana plasmática, desencadena su asociación con otras proteínas, promueve su fosforilación y estimula su actividad enzimática. Por tanto, la asociación de estas proteínas con los receptores autofosforila-

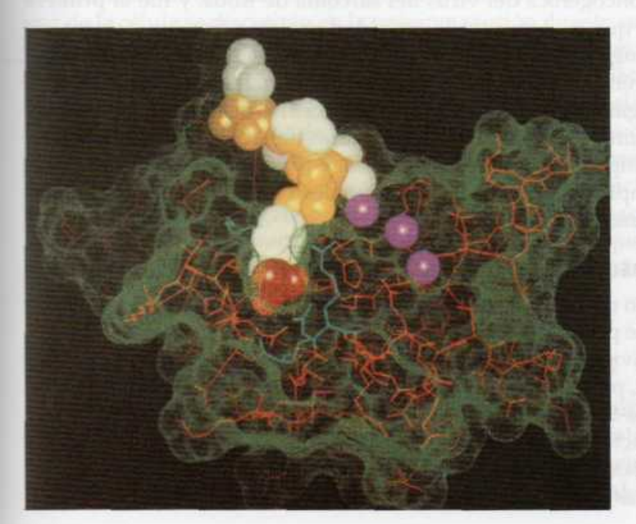


Figura 15.17 Complejo constituido por un dominio SH2 y un péptido con fosfotirosina. La cadena polipeptídica del dominio SH2 de la Src se muestra en color rojo y su superficie se indica con el punteado verde. Las bolas moradas muestran un surco en la superficie. Los tres residuos aminoacídicos que interaccionan con la fosfotirosina aparecen en azul. El péptido con fosfotirosina se ha representado por un modelo tridimensional de espacio lleno. Las bolas amarillas y blancas indican, respectivamente, los átomos del esqueleto y de las cadenas laterales, y el grupo fosfato aparece en rojo. (A partir de G. Waksman y 13 colaboradores, 1992. *Nature* 358:646.)

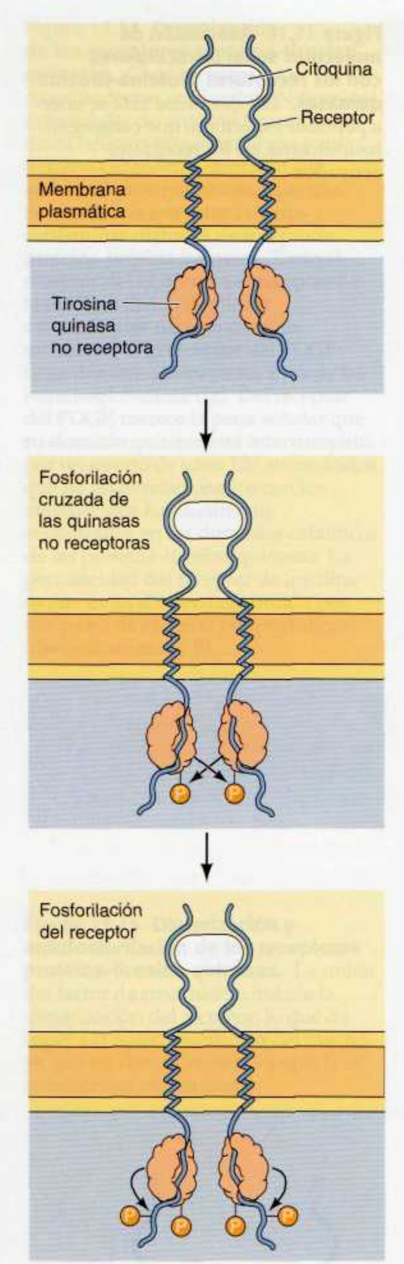


Figura 15.18 Señalización a partir del receptor de citoquinas. La unión del ligando induce la dimerización de los receptores, y conduce a la activación de las proteína-tirosina quinasas no receptoras asociadas debido a una fosforilación cruzada. Seguidamente, las quinasas activadas fosforilan residuos de tirosina del receptor, dando lugar a sitios de unión de fosfotirosina para las moléculas señal intracelulares.

dos supone el primer paso en la transmisión intracelular de señales, que comenzó con la unión de los factores de crecimiento a la superficie celular.

Receptores de citoquinas y proteína-tirosina quinasas no receptoras

Muchos receptores, en vez de tener ellos mismos la actividad proteína-tirosina quinasa, actúan estimulando a proteína-tirosina quinasas a las que no están unidas covalentemente. Esta familia de receptores (denominada la **superfamilia de receptores de citoquinas**) incluye a los receptores de la mayoría de las citoquinas (p. ej., la interleuquina-2 y la eritropoyetina) y a los receptores de algunas hormonas polipeptídicas (p. ej., la hormona del crecimiento). Al igual que los receptores proteína-tirosina quinasas, éstos están constituidos por un dominio N-terminal, extracelular, de unión a ligando, una única hélice α transmembrana, y un dominio C-terminal citosólico. Sin embargo, el dominio citosólico de los receptores de citoquinas carece de actividad catalítica conocida. En vez de esto, los receptores de citoquinas actúan en asociación con **proteína-tirosina quinasas no receptoras**, las cuales son activadas por la unión del ligando al receptor.

Se piensa que el primer paso de la señalización a partir del receptor de citoquinas es la dimerización del receptor inducida por ligando y la fosforilación cruzada de las proteína-tirosina quinasas no receptoras asociadas (Fig. 15.18). Estas quinasas activadas fosforilarán al receptor, lo que proporcionará sitios de unión de fosfotirosina para las moléculas señal intracelulares que tengan dominios SH2. Por tanto, la combinación de los receptores de citoquinas más las proteína-tirosina quinasas no receptoras asociadas, funciona de la misma manera que lo hacen los receptores con actividad proteína-tirosina quinasa tratados en la sección anterior.

Las quinasas asociadas con los receptores de citoquinas pertenecen a la familia de las **quinasas Janus**, o **JAK**, formada por cuatro proteína-tirosina quinasas no receptoras relacionadas. Los miembros de la familia JAK parecen ser universalmente necesarios para la señalización a través de receptores de citoquinas, lo que indica que las quinasas de la familia JAK juegan un papel crítico en el acoplamiento de estos receptores a la fosforilación en tirosinas de dianas intracelulares.

Las proteína-tirosina quinasas no receptoras adicionales pertenecen a la familia **Src**, que está formada por Src y ocho proteínas estrechamente relacionadas. Como ya se ha indicado, Src fue inicialmente identificada como una proteína oncogénica del virus del sarcoma de Rous, y fue la primera proteína en la que se demostró la actividad proteína-tirosina quinasa, de modo que ha jugado un papel clave en los experimentos que han llevado a nuestra comprensión actual de la señalización celular. Los miembros de la familia Src juegan papeles clave en la señalización desencadenada de receptores de citoquinas, proteína-tirosina quinasas de receptores, desde los receptores de antígeno en los linfocitos B y T, y (como se estudiará más adelante en este capítulo) desde la integrinas en los puntos de adhesión celular a la matriz extracelular.

Receptores asociados a otras actividades enzimáticas

Aunque la gran mayoría de los receptores asociados a enzimas estimulan la fosforilación de proteína-tirosinas, algunos receptores se encuentran asociados a otras actividades enzimáticas. Estos receptores incluyen proteína-tirosina fosfatasas, proteína-serina/treonina quinasas y guanilato ciclasas.

Las **proteína-tirosina fosfatasas** quitan grupos fosfato de los residuos de fosfotirosina, actuando de manera opuesta a las proteína-tirosina quinasas. En muchos casos, las proteína-tirosina fosfatasas actúan como reguladores negativos en las vías de señalización celular, ya que se encargan de inte-

interrumpir las señales que se activaron a partir de la fosforilación de las proteína-tirosinas. Sin embargo, algunas proteína-tirosina fosfatasas son receptores de superficie celular cuya actividad enzimática es un mecanismo de regulación positiva en la señalización celular: el genoma humano codifica 21 receptores de dicho tipo de proteína-tirosina fosfatasa. Un buen ejemplo de esto último lo proporciona el receptor denominado CD45, que se expresa en la superficie de los linfocitos B y T. Tras la estimulación por el antígeno, parece ser que el CD45 desfosforila una fosfotirosina específica, la cual inhibe la actividad enzimática de miembros de la familia Src. Por tanto, la función de la proteína-tirosina fosfatasa CD45 es, paradójicamente, la de activar proteína-tirosina quinasas no receptoras.

Los receptores para el **factor de crecimiento transformante β (TGF-β)** y otros polipéptidos relacionados, son proteína quinasas que fosforilan residuos de serina o treonina de sus proteínas sustrato, en vez de restos de tirosina. El TGF-β es el prototipo de una familia de factores de crecimiento polipeptídicos que controlan la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares de una variedad de tipos celulares. La clonación del primer receptor para un miembro de la familia de los TGF-β, puso de manifiesto que es el modelo de una familia específica de receptores con un dominio **proteína-serina/treonina quinasa**. Desde entonces, los receptores encontrados para otros miembros de la familia de los TGF-β también han resultado ser proteína-serina/treonina quinasas. La unión del ligando a estos receptores provoca la asociación de dos cadenas polipeptídicas distintas, codificadas por miembros distintos de la familia de los receptores de TGF-β, dando lugar a heterodímeros en los que los receptores con actividad quinasa se fosforilan mutuamente de manera cruzada. Entonces, los receptores de TGF-β activados fosforilan a los miembros de una familia de factores de transcripción denominados SMAD, los cuales se translocan al núcleo y activan la expresión de los genes diana.

Algunos ligandos peptídicos se unen a receptores cuyos dominios citosólicos tienen actividad guanilato ciclasa, catalizando la formación de GMP cíclico. *Como se dijo anteriormente, el óxido nítrico y monóxido de carbono* también activa la guanilato ciclasa, pero la diana de estos gases es una enzima intracelular en vez de un receptor transmembrana. Los receptores **guanilato ciclasa** tienen un dominio extracelular de unión al ligando, una única hélice α transmembrana, y un dominio citosólico con actividad catalítica. La unión al ligando estimula la actividad catalítica, dando lugar a la formación de GMP cíclico —un segundo mensajero cuyos efectos en el interior de la célula se discutirán en la próxima sección de este capítulo.

Otros receptores se unen a proteínas citoplasmáticas con actividad bioquímica diferente. Por ejemplo, la citoquina factor de necrosis tumoral (TNF) induce la muerte celular, quizá (como se analiza en el Cap. 17) como un mecanismo de eliminar de los tejidos células excedentes o deterioradas. Los receptores del TNF y de otras moléculas relacionadas, señalizadoras de muerte celular, se asocian a proteasas específicas, que son activadas en respuesta a la unión del ligando. La activación de estas proteasas asociadas a receptor dispara la activación de proteasas posteriores, lo que lleva, en última instancia, a la degradación de varios tipos de proteínas intracelulares y a la muerte de la célula.

■ Los receptores de citoquinas son empleados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como receptores de la superficie celular para la infección de las células inmunitarias.

Vías de transducción intracelular de señales

La mayoría de los receptores de superficie celular activan enzimas diana intracelulares, las cuales pueden estar, bien unidas directamente a los receptores, o bien asociadas a ellos a través de proteínas G. Estas enzimas intracelulares sirven como elementos que transmiten la señal hacia lugares

ATP → Adenilato ciclasa → AMP cíclico → AMPc fosfodiesterasa → AMP

Figura 15.19 Síntesis y degradación del AMPc. El AMP cíclico se sintetiza a partir del ATP por la adenilato ciclasa y es degradado a AMP por la AMPc fosfodiesterasa.

posteriores en el interior celular, propagando y amplificando la señal iniciada por la unión del ligando. En la mayoría de los casos, una cascada de reacciones transmite la señal desde la superficie celular hasta diversas dianas intracelulares —un proceso denominado **transducción intracelular de señales**—. Las dianas de estas vías de señalización suelen ser factores de transcripción cuya función es regular la transcripción génica. Por tanto, los mecanismos de señalización intracelular conectan la superficie celular con el núcleo, dando lugar a variaciones en la expresión génica como respuesta a los estímulos extracelulares.

Vía del AMPc: segundos mensajeros y fosforilación de proteínas

La señalización intracelular se puso de manifiesto por primera vez al estudiar la acción de hormonas tales como la epinefrina, que causa la hidrólisis del glucógeno a glucosa previa a la actividad muscular. En 1958, Earl Sutherland descubrió que la acción de la epinefrina era mediada por un aumento en la concentración intracelular de **AMP cíclico (AMPc)**, lo que llevó a la idea de que el AMPc es un **segundo mensajero** de la señalización hormonal (siendo la hormona el primer mensajero). El AMP se forma a partir del ATP por la acción de la **adenilato ciclasa** y es degradado a AMP por la **AMPc fosfodiesterasa** (Fig. 15.19). Como ya se señaló anteriormente, el receptor de la epinefrina está asociado a la adenilato ciclasa vía una proteína G que estimula su actividad enzimática, dando lugar al aumento de la concentración intracelular de AMPc (véase Fig. 15.12).

Entonces, ¿cómo señaliza el AMPc la rotura del glucógeno? Éste y la mayoría de los efectos del AMPc en la célula animal son mediados por la acción de la **proteína quinasa dependiente de AMPc**, o **proteína quinasa A**, una enzima descubierta por Donald Walsh y Ed Krebs en 1968. La forma inactiva de la proteína quinasa A es un tetrámero constituido por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas (Fig. 15.20). El AMP cíclico se une a las subunidades reguladoras provocando su disociación de las subunidades catalíticas. Las subunidades catalíticas libres son enzimáticamente activas y son capaces de fosforilar residuos de serina de sus proteínas diana.

En la regulación del metabolismo del glucógeno, la proteína quinasa A fosforila a dos proteínas diana (Fig. 15.21). La primera es otra proteína quinasa, la fosforilasa quinasa, que es fosforilada y activada por la proteína quinasa A. La fosforilasa quinasa, a su vez, fosforila y activa a la glucógeno fosforilasa, que cataliza la rotura del glucógeno a glucosa-1-fosfato. Además, la proteína quinasa A fosforila la enzima glucógeno sintetasa, que cataliza la síntesis de glucógeno. En este caso, la fosforilación inhibe la actividad enzimática. Por tanto, el incremento del AMPc y la activación de la proteína quinasa A bloquea la síntesis de glucógeno a la vez que activa su hidrólisis.

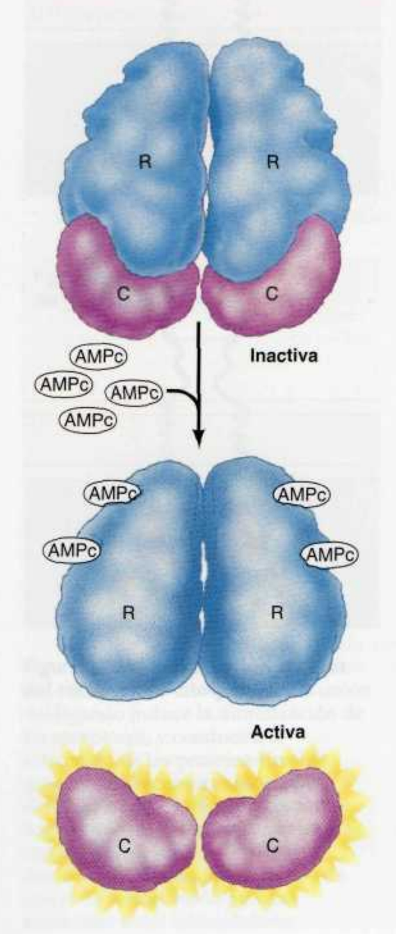


Figura 15.20 Regulación de la proteína quinasa A. La forma inactiva de la proteína quinasa A está constituida por dos subunidades reguladoras (R) y por dos subunidades catalíticas (C). La unión del AMPc a las subunidades reguladoras induce un cambio conformacional que lleva a la disociación de las subunidades catalíticas, de lo que resulta la activación enzimática de éstas.

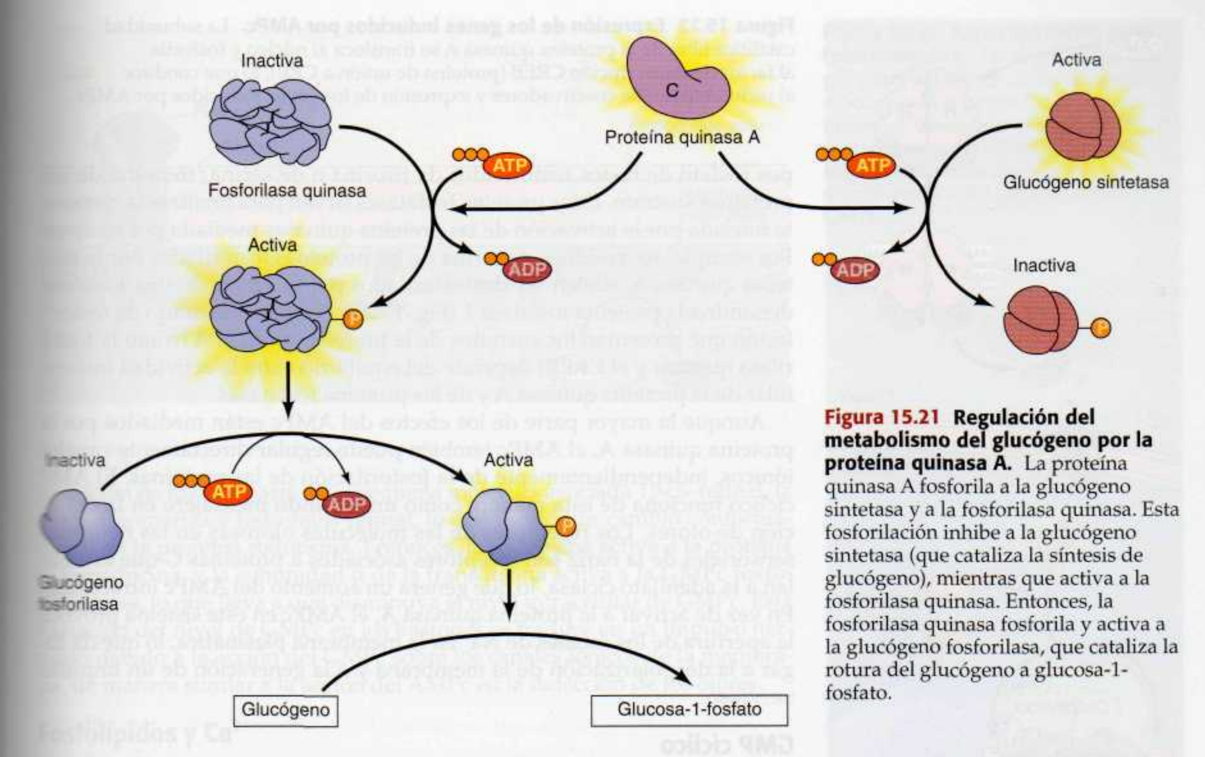


Figura 15.21 Regulación del metabolismo del glucógeno por la proteína quinasa A. La proteína quinasa A fosforila a la glucógeno sintetasa y a la fosforilasa quinasa. Esta fosforilación inhibe a la glucógeno sintetasa (que cataliza la síntesis de glucógeno), mientras que activa a la fosforilasa quinasa. Entonces, la fosforilasa quinasa fosforila y activa a la glucógeno fosforilasa, que cataliza la rotura del glucógeno a glucosa-1-fosfato.

La cadena de reacciones que conduce desde el receptor de la epinefrina hasta la glucógeno fosforilasa proporciona un buen ejemplo de la amplificación de la señal durante la transducción de señales intracelular. Cada molécula de epinefrina activa un único receptor. Sin embargo, cada receptor puede activar hasta 100 moléculas de G_s. Cada molécula de G_s activa a la adenilato ciclasa, que cataliza la síntesis de muchas moléculas de AMPc. La señal continúa amplificándose puesto que cada molécula de proteína quinasa A fosforila muchas moléculas de fosforilasa quinasa, que, a su vez, fosforilan muchas moléculas de glucógeno fosforilasa. Por tanto, la unión de la hormona a un pequeño número de receptores da lugar a la activación de un número mucho mayor de enzimas diana intracelulares.

15.3 **Animación web**

Amplificación de la señal

En una cascada de transducción de la señal, cada enzima activada en un estadio de la cascada puede activar a 100 moléculas de la siguiente enzima, amplificando rápidamente la respuesta al ligando unido a su receptor.

En muchas células animales, el aumento del AMPc activa la transcripción de unos genes diana específicos que contienen una secuencia reguladora denominada **elemento de respuesta a AMPc**, o **CRE** (Fig. 15.22). En este caso, la señal desde el citoplasma al núcleo la lleva la subunidad catalítica de la proteína quinasa A, que es capaz de entrar en el núcleo tras su desacoplamiento de la subunidad reguladora. En el núcleo, la proteína quinasa A fosforila a un factor de transcripción denominado **CREB** (de proteína de unión a CRE), lo que activa al reclutamiento de coactivadores y la transcripción de genes inducibles por AMPc. Este tipo de regulación de la expresión génica por el AMPc desempeña un papel importante en el control de la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de diversos tipos de células animales, además de estar implicada en los procesos de aprendizaje y la memoria.

Es importante señalar que las proteína quinasas, como la proteína quinasa A, no actúan de manera aislada en la célula. Por el contrario, la fosforilación de las proteínas es revertida rápidamente por la acción de las proteína fosfatasas. Algunas proteína fosfatasas son receptoras de membrana, como se dijo en la sección anterior. Otras son enzimas citosólicas que quitan gru-

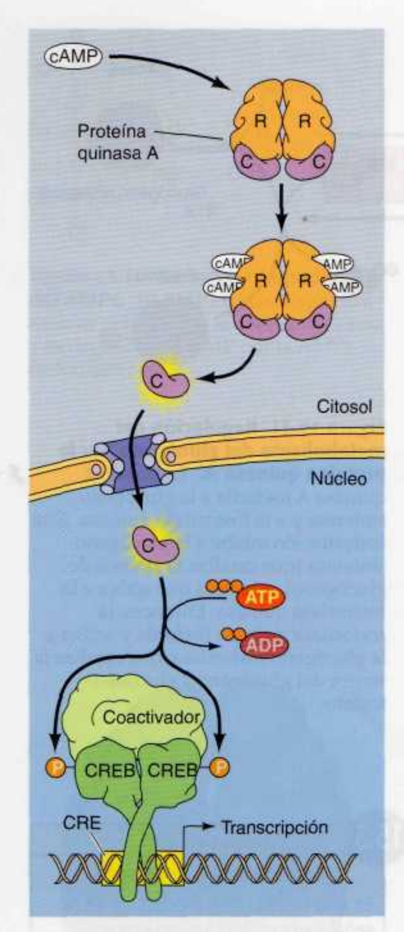


Figura 15.22 Expresión de los genes inducidos por AMPc. La subunidad catalítica libre de la proteína quinasa A se transloca al núcleo y fosforila al factor de transcripción CREB (proteína de unión a CRE), lo que conduce al reclutamiento de coactivadores y expresión de los genes inducidos por AMPc.

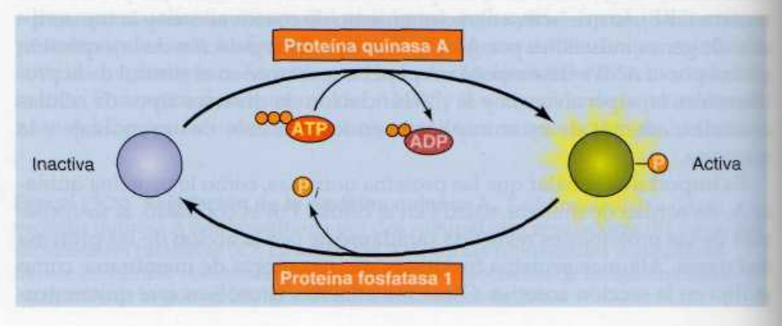
pos fosfato de restos fosforilados de tirosina o de serina/treonina de sus proteínas sustrato. Estas proteína fosfatasas sirven para finalizar la respuesta iniciada por la activación de las proteína quinasas mediada por receptor. Por ejemplo, los residuos de serina de las proteínas fosforilados por la proteína quinasa A, suelen ser desfosforilados por la acción de una fosfatasa denominada proteína fosfatasa 1 (Fig. 15.23). Por tanto, el grado de fosforilación que presentan los sustratos de la proteína quinasa A (como la fosforilasa quinasa y el CREB) depende del equilibrio entre la actividad intracelular de la proteína quinasa A y de las proteína fosfatasas.

Aunque la mayor parte de los efectos del AMPc están mediados por la proteína quinasa A, el AMPc también puede regular directamente canales iónicos, independientemente de la fosforilación de las proteínas. El AMP cíclico funciona de esta manera como un segundo mensajero en la detección de olores. Los receptores de las moléculas olorosas en las neuronas sensoriales de la nariz son receptores asociados a proteínas G que estimulan a la adenilato ciclasa, lo que genera un aumento del AMPc intracelular. En vez de activar a la proteína quinasa A, el AMPc en este sistema provoca la apertura de los canales de Na^+ en la membrana plasmática, lo que da lugar a la despolarización de la membrana y a la generación de un impulso nervioso.

GMP cíclico

El **GMP cíclico (GMPc)** también es un segundo mensajero importante en las células animales, aunque su papel no se ha estudiado con el mismo detalle que los del AMPc. El GMP cíclico se sintetiza a partir del GTP por la guanilato ciclasa y es degradado a GMP por una fosfodiesterasa. Como ya se trató anteriormente en este capítulo, tanto el óxido nítrico como determinados ligandos peptídicos activan diferentes tipos de guanilato ciclasas. La activación de las guanilato ciclasas aumenta el nivel del GMPc, el cual interviene como mediador de respuestas biológicas, como, por ejemplo, la vasodilatación. El GMPc ejerce su función a través de una proteína quinasa dependiente de GMPc, aunque también puede actuar sobre otras dianas, como por ejemplo canales iónicos y las fosfodiesterasas.

En el ojo de los vertebrados es donde está mejor caracterizada la acción del GMPc, donde actúa como el segundo mensajero responsable de convertir las señales visuales recibidas en forma de luz en impulsos nerviosos. El fotorreceptor en los bastones de la retina es un receptor asociado a una proteína G denominado **rodopsina** (Fig. 15.24). La rodopsina se activa por la



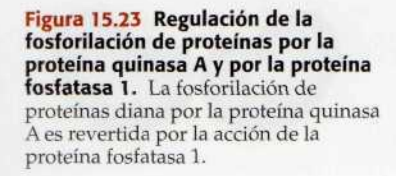


Figura 15.23 Regulación de la fosforilación de proteínas por la proteína quinasa A y por la proteína fosfatasa 1. La fosforilación de proteínas diana por la proteína quinasa A es revertida por la acción de la proteína fosfatasa 1.

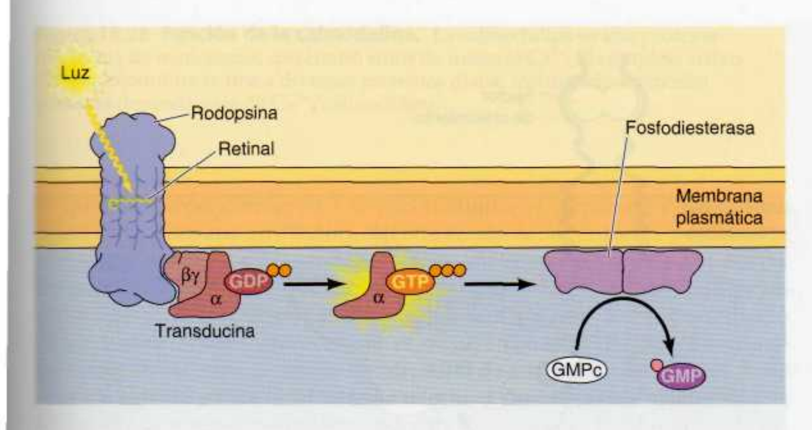


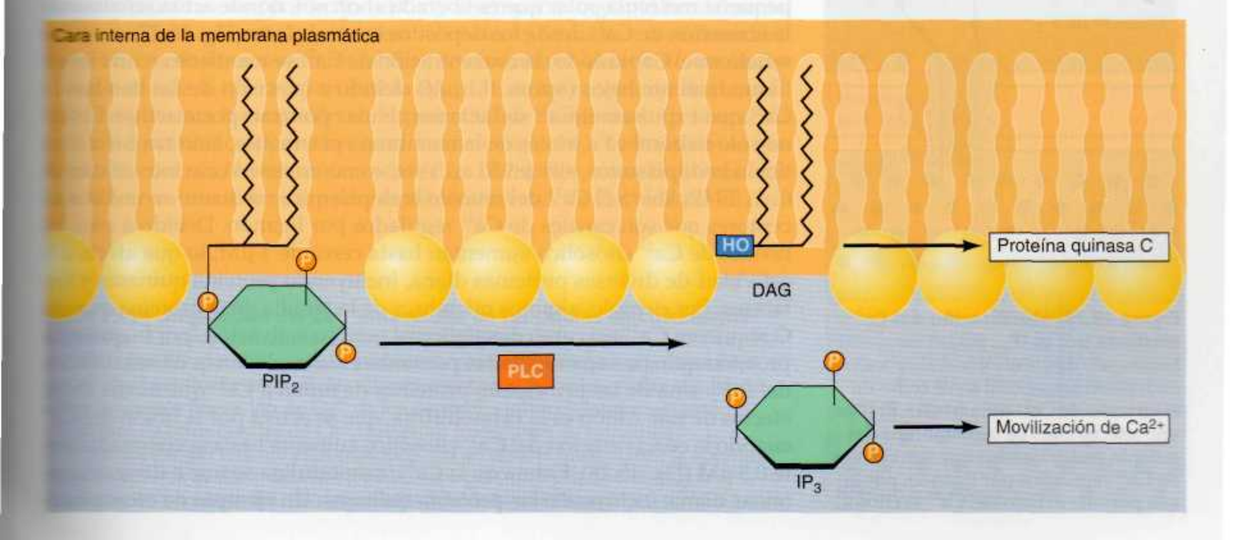
Figura 15.24 Papel del GMPc en la fotorrecepción. La absorción de luz por parte del retinal activa al receptor asociado a la proteína G rodopsina. Entonces, la subunidad α de la transducina activa a la GMPc fosfodiesterasa, lo que lleva a que disminuya el nivel intracelular de GMPc.

absorción de luz por parte de la pequeña molécula asociada 11-*cis*-retinal, la cual se isomeriza a todo-*trans*-retinal, lo que induce un cambio conformacional en la proteína rodopsina. Entonces, la rodopsina activa a la proteína G **transducina**, y la subunidad α de la transducina activa a la **GMPc fosfodiesterasa**, lo que lleva a que disminuya el nivel intracelular de GMPc. Esta variación del nivel de GMPc en los bastones se traduce en un impulso nervioso debido a la acción del GMPc sobre los canales iónicos de la membrana, de manera similar a la acción del AMPc en la detección de los olores.

Fosfolípidos y Ca^{2+}

Las dos vías principales de señalización intracelular se basan en la utilización de segundos mensajeros derivados del fosfolípido de membrana **fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP_2)**. El PIP_2 es un componente minoritario de la membrana plasmática, que se localiza en la cara interna de la bicapa fosfolipídica (véase Fig. 13.2). Diversidad de hormonas y factores de crecimiento inducen la hidrólisis del PIP_2 por la **fosfolipasa C** —una reacción que da lugar a dos segundos mensajeros diferentes, el **diacilglicerol** y el **inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3)** (Fig. 15.25)—. El diacilglicerol y el IP_3 activan vías de señalización intracelular diferentes (a la proteína quinasa C y la mo-

Figura 15.25 Hidrólisis del PIP_2. La fosfolipasa C (PLC) cataliza la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP_2) dando lugar al diacilglicerol (DAG) y al inositol trifosfato (IP_3). El diacilglicerol activa a *miembros de la familia de la proteína* quinasa C, y el IP_3 induce la liberación del Ca^{2+} de los reservorios intracelulares.



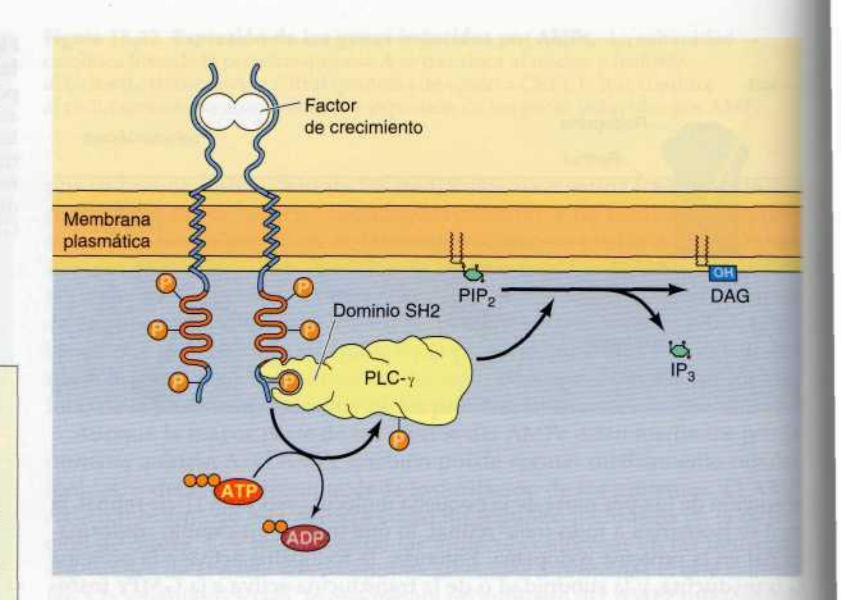


Figura 15.26 Activación de la fosfolipasa C por proteína-tirosina quinasas. La fosfolipasa C-γ (PLC-γ) se une al receptor proteína-tirosina quinasa activado a través de su dominio SH2. La fosforilación de las tirosinas aumenta la actividad de la PLC-γ, lo que estimula la hidrólisis del PIP_2.

Los venenos tóxicos procedentes de serpientes contienen fosfolipasas. La hidrólisis de fosfolípidos por el veneno procedente de la serpiente cascabel y de la cobra dan lugar a la rotura de las membranas de los glóbulos rojos.

vilización del Ca^{2+}, respectivamente), por lo que la hidrólisis del PIP_2 dispara una doble cascada de señales intracelulares.

Hay que destacar que la hidrólisis del PIP_2 es activada posteriormente (*downstream*) a los receptores acoplados a las proteínas G y a las proteína-tirosina quinasas. Esto se debe a que una isoforma de la fosfolipasa C (PLC-β) es activada por las proteínas G, mientras que otra (PLC-γ) contiene dominios SH2 responsables de su asociación con receptores proteína-tirosina quinasas activados (Fig. 15.26). Esta interacción es la responsable de la localización de la PLC-γ próxima a la membrana plasmática, así como de la fosforilación de sus tirosinas, lo que aumenta su actividad catalítica.

El diacilglicerol producido por la hidrólisis de PIP_2 permanece asociado a la membrana plasmática y activa las proteína-serina/treonina quinasas pertenecientes a la familia de la **proteína quinasa C**, muchas de las cuales juegan papeles importantes en el control del crecimiento y diferenciación celular. El otro segundo mensajero producido por la escisión de PIP_2, IP_3, es una pequeña molécula polar que es liberada al citosol, donde actúa señalizando la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (Fig. 15.27). Como se señaló en el Capítulo 13, la concentración de Ca^{2+} se mantiene en niveles extremadamente bajos (aprox. 0,1 μ*M*) debido a la acción de las bombas de Ca^{2+} que expulsan el Ca^{2+} del interior celular por transporte activo. El Ca^{2+} no sólo se bombea a través de la membrana plasmática, sino también al retículo endoplásmico, sirviendo así, éste, como un reservorio intracelular de Ca^{2+}. El IP_3 libera el Ca^{2+} del retículo endoplásmico mediante su unión a receptores que son canales de Ca^{2+} regulados por ligando. Debido a esto, los niveles de Ca^{2+} citosólico aumentan hasta cerca de 1 μM, lo que afecta a la actividad de diversas proteínas diana, incluyendo proteína quinasas y fosfatasas. Por ejemplo, algunos miembros de la familia de la proteína quinasa C requieren Ca^{2+} así como diacilglicerol para su activación, por lo que estas proteína quinasas son reguladas por ambas ramas de la vía de señalización del PIP_2. Una de las principales proteínas de unión a Ca^{2+} que media en los efectos de este catión es la **calmodulina**, que se activa por la unión del Ca^{2+} cuando la concentración del Ca^{2+} citosólico aumenta hasta aproximadamente 0,5 μM (Fig. 15.28). Entonces, la Ca^{2+}/calmodulina se une a diversas proteínas diana, incluyendo las proteína quinasas. Un ejemplo de estas proteí-

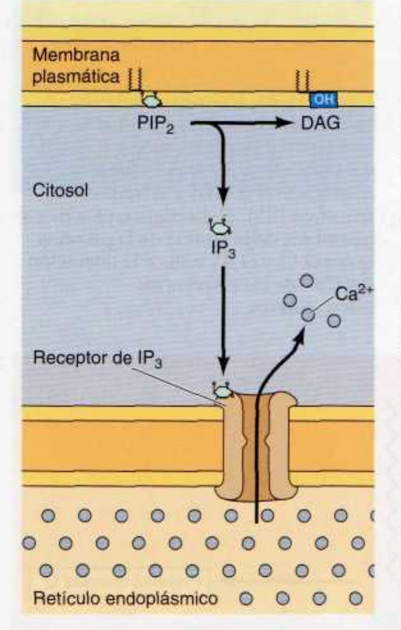


Figura 15.27 Movilización del Ca^{2+} mediada por el IP_3. El Ca^{2+} es bombeado desde el citosol al retículo endoplásmico, el cual sirve como un reservorio de Ca^{2+} intracelular. El IP_3 se une a receptores en la membrana del retículo endoplásmico que son canales de Ca^{2+} regulados por ligando, por lo que permite el flujo del Ca^{2+} al citosol.

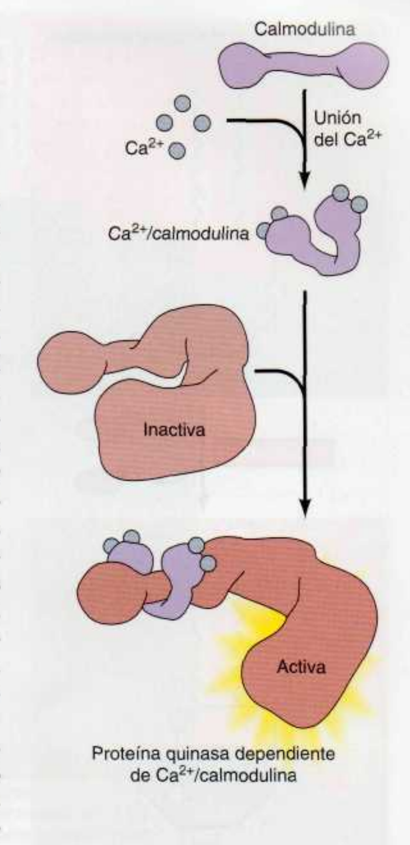


Figura 15.28 Función de la calmodulina. La calmodulina es una proteína con forma de mancuerna, con cuatro sitios de unión al Ca^{2+}. El complejo activo Ca^{2+}/calmodulina se une a diversas proteínas diana, incluyendo a proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}/calmodulina.

na quinasas dependientes de Ca^{2+}/calmodulina es la quinasa de la cadena ligera de la miosina, que induce la contracción actina-miosina mediante la fosforilación de una de las cadenas ligeras de la miosina (véase Fig. 12.31). Otras proteína quinasas que son activadas por la Ca^{2+}/calmodulina incluyen a miembros de la familia de las **quinasas CaM**, que fosforilan a distintos tipos de proteínas, entre las que se incluyen enzimas metabólicas, canales iónicos y factores de transcripción. Una de las formas de quinasa CaM abunda especialmente en el sistema nervioso, donde regula la síntesis y la liberación de neurotransmisores. Además, las quinasas CaM regulan la expresión génica a través de la fosforilación de factores de transcripción. Es interesante señalar que uno de los factores de transcripción fosforilados por la quinasa CaM es el CREB, que es fosforilado en el mismo sitio por la proteína quinasa A. Esta fosforilación del CREB ilustra una de las múltiples interacciones entre las vías de señalización del Ca^{2+} y del AMPc. Otros ejemplos serían la regulación de las adenilato ciclasas y de las fosfodiesterasas por la Ca^{2+}/calmodulina, la regulación de los canales de Ca^{2+} por el AMPc, y la fosforilación de determinadas proteínas diana tanto por la proteína quinasa A como por quinasas dependientes de Ca^{2+}/calmodulina. Por tanto, las vías de señalización del Ca^{2+} y del AMPc funcionan de manera coordinada en la regulación de multitud de respuestas celulares.

Los aumentos de la concentración intracelular de Ca^{2+} no obedecen exclusivamente a la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, sino que también pueden deberse a la captación de Ca^{2+} extracelular a través de canales regulados de la membrana plasmática. La entrada de Ca^{2+} extracelular es particularmente importante en las células nerviosas y musculares eléctricamente excitables, en las que los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje de la membrana plasmática se abren debido a la despolarización de la membrana (Fig. 15.29). El incremento de Ca^{2+} resultante dispara, a su vez, la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, mediante la activación de canales de Ca^{2+} diferentes denominados **receptores de rianodina**. En las neuronas, uno de los efectos del aumento del Ca^{2+} intracelular es activar la liberación de los neurotransmisores, por lo que el Ca^{2+} desempeña un papel fundamental en la conversión de señales eléctricas a señales químicas en el sistema nervioso. En las células musculares, el Ca^{2+} se acumula en el retículo sarcoplásmico, de donde se libera a partir de la apertura de los receptores de rianodina en respuesta a la variación en el potencial de membrana. La liberación del Ca^{2+} acumulado supone un gran incremento del Ca^{2+} citosólico, lo que dispara la contracción muscular (véase Fig. 12.28). Por tanto, las células utilizan diversos mecanismos para regular los niveles de Ca^{2+} intracelular, lo

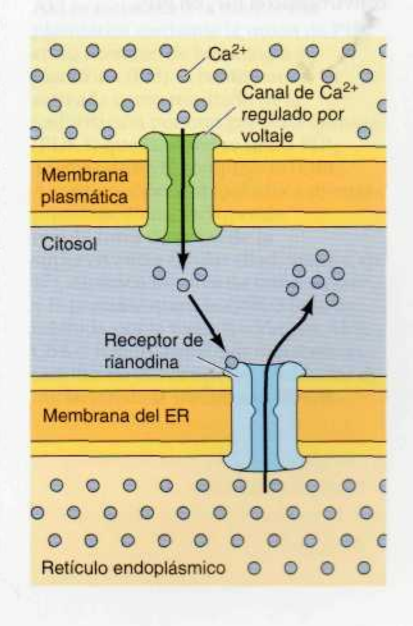


Figura 15.29 Regulación del Ca^{2+} intracelular en las células eléctricamente excitables. La despolarización de la membrana provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje de la membrana plasmática, lo que supone el flujo de Ca^{2+} desde el fluido extracelular. El incremento de Ca^{2+} intracelular resultante activa la ulterior liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares mediante la apertura de otros canales de Ca^{2+} diferentes (receptores de rianodina) en la membrana del retículo endoplásmico. En las células musculares, la apertura de los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico puede tener lugar directamente, en respuesta a la despolarización de la membrana.

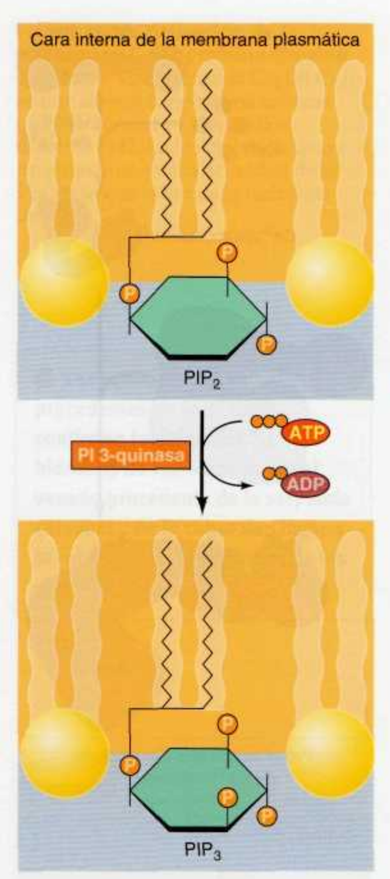


Figura 15.30 Actividad de la PI 3-quinasa. La PI 3-quinasa fosforila la posición 3 del inositol, convirtiendo el PIP_2 en PIP_3.

que hace del Ca^{2+} un segundo mensajero muy versátil que controla un amplio rango de procesos celulares.

Las vías PI 3-Quinasa/Akt y mTOR

El PIP_2 no sólo funciona como fuente de diacilglicerol e IP_3, sino que además constituye el punto de partida de una vía de segundo mensajero diferente que juega un papel clave en la regulación del crecimiento y supervivencia celular. En esta vía, el PIP_2 es fosforilado en la posición 3 del inositol por la enzima **fosfatidilinosítido (PI) 3-quinasa** (Fig. 15.30). Al igual que la fosfolipasa C, una forma de PI 3-quinasa es activada por las proteínas G, mientras que una segunda forma posee dominios SH2 y es activada mediante su asociación con receptores de proteína-tirosina quinasas. La fosforilación de PIP_2 genera el segundo mensajero **fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3)**.

Una diana clave del PIP_3, que es crítica para la señalización durante la proliferación y supervivencia celular, es una proteína-serina/treonina quinasa denominada **Akt**. El PIP_3 se une a un dominio del Akt conocido como el dominio de homología con plecstrina (Fig. 15.31). Esta interacción recluta a Akt en la cara interna de la membrana plasmática, donde es fosforilado y activado por otra proteína quinasa (denominada PDK1) que también contiene un dominio de homología con plecstrina y une PIP_3. La formación de PIP_3 por tanto, resulta en la asociación tanto de Akt como PDK1 con la membrana plasmática, desencadenando la fosforilación y activación de Akt. La activación de Akt también requiere la fosforilación en una segunda diana por parte de una proteína quinasa diferente (mTOR en un complejo conocido como mTORC2), que también puede ser estimulado por factores de crecimiento.

Una vez activado, Akt fosforila a un número de proteínas diana, incluyendo proteínas que son reguladores directos de la supervivencia celular (analizados en el Cap. 17), factores de transcripción y otras proteína quinasas. Los factores de transcripción críticos que son diana de Akt incluyen miembros de la familia *forkhead* (cabeza de horquilla) o FOXO (Fig. 15.32). La fosforilación de FOXO por Akt crea un sitio de unión para las chaperonas citosólicas (proteínas 14-3-3) que secuestran a FOXO en una forma inactiva en el citoplasma. En ausencia de la señalización por factores de crecimiento y de actividad de Akt, FOXO es liberado de 14-3-3 y se transloca al núcleo, estimulando la transcripción de genes que inhiben la proliferación celular o inducen la muerte celular. Otra diana de Akt es la proteína quinasa GSK-3, que regula el metabolismo además de la proliferación y supervivencia celular. Al igual que FOXO, GSK-3 es inhibido por la fosforilación de Akt. Las dianas de GSK-3 incluyen diversos factores de transcripción y el factor de iniciación de la traducción eIF2B. La fosforilación de eIF2B lleva al descenso global de la iniciación de la traducción (véase Fig. 8.20), de forma que GSK-3 proporciona un enlace entre la señalización de los factores de crecimiento y el control de la síntesis proteica celular.

La vía **mTOR** es un regulador central del crecimiento celular que acopla el control de la síntesis proteica con la disponibilidad de factores de crecimiento, nutrientes y energía (Fig. 15.33). Esto se consigue mediante la regulación de mTOR a través de múltiples señales, incluyendo la vía PI 3-quinasa/Akt. La proteína quinasa mTOR existe en dos complejos diferentes en las células. Como se ha indicado anteriormente, el complejo mTORC2 es una de las proteínas quinasas que fosforila y activa a Akt (véase Fig. 15.31). Por el contrario, el complejo mTORC1 es activado corriente abajo de Akt y funciona para regular el tamaño celular, al menos en parte mediante el control de la síntesis proteica. El complejo mTORC1 está regulado por las proteínas de unión a GTP relacionada con Ras Rheb, que a su vez es regulada

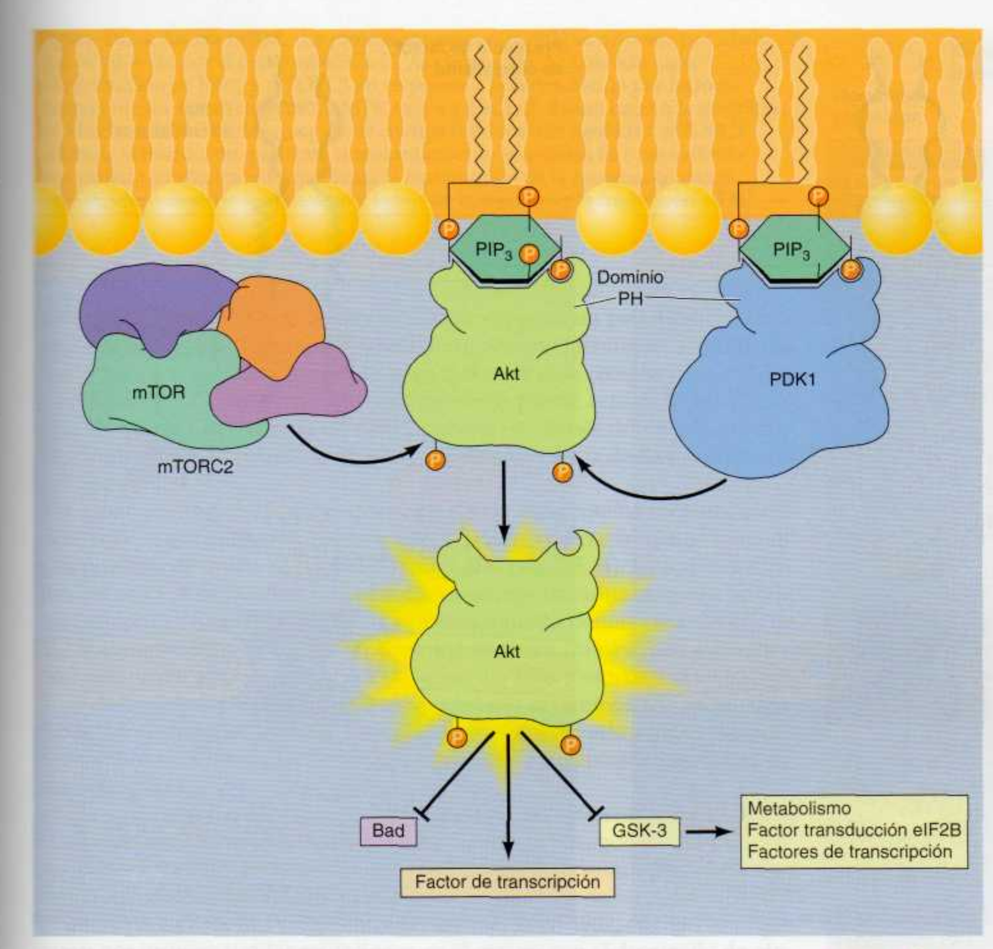


Figura 15.31 La vía PI 3-quinasa/Akt. Akt es reclutada a la membrana plasmática mediante la unión de PIP_3 en su dominio de homología a plecstrina (PH). A continuación es activada como resultado de la fosforilación por otra proteína quinasa (PDK1) que también se une a PIP_3, además de en el complejo mTORC. A continuación Akt fosforila a diversas proteínas diana, incluyendo reguladores directos de la supervivencia celular (Bad, véase Cap. 17), diversos factores de transcripción, y la proteína quinasa GSK-3 (que es inhibida por la fosforilación por Akt). GSK-3 fosforila enzimas metabólicas, factores de transcripción, y el factor de iniciación de la traducción eIF-2B.

por el complejo proteico activador de GTPasa TSC1/2. Akt fosforila e inhibe la actividad de TSC1/2, lo que provoca la activación de mTORC1 como respuesta. Adicionalmente, TSC1/2 está regulado por otra proteína quinasa denominada la quinasa activada por AMP (AMPK). La AMPK detecta el estado energético de la célula y es activada por una elevada proporción de AMP frente a ATP. Bajo estas condiciones, AMPK fosforila y activa TSC1/2, dando lugar a la inhibición de mTORC1 cuando las reservas energéticas celulares están vacías. TSC1/2 a su vez es regulada por la disponibilidad de aminoácidos, aunque el mecanismo responsable sigue sin determinarse.

El complejo mTORC1 fosforila al menos a dos dianas bien caracterizadas que funcionan para regular la síntesis proteica: la quinasa S6 y la proteína 1 de unión a eIF4E (4E-BP1). La quinasa S6 controla la traducción mediante la fosforilación de la proteína ribosómica S6 además de otras proteínas implicadas en la regulación de la traducción. La proteína de unión a eIF4E controla la traducción mediante su interacción con el factor de iniciación eIF4E, que se une a la caperuza 5′ del ARNm (véase Fig. 8.21). En ausencia de señalización por parte de mTOR, las 4E-BP no fosforiladas se unen a eIF4E e inhiben la traducción interfiriendo con la interacción de eIF4E con eIF4G. La fosforilación de 4E-BP1 por parte de mTOR previene su interacción con eIF4E, dando lugar a tasas incrementadas de iniciación de la traducción.

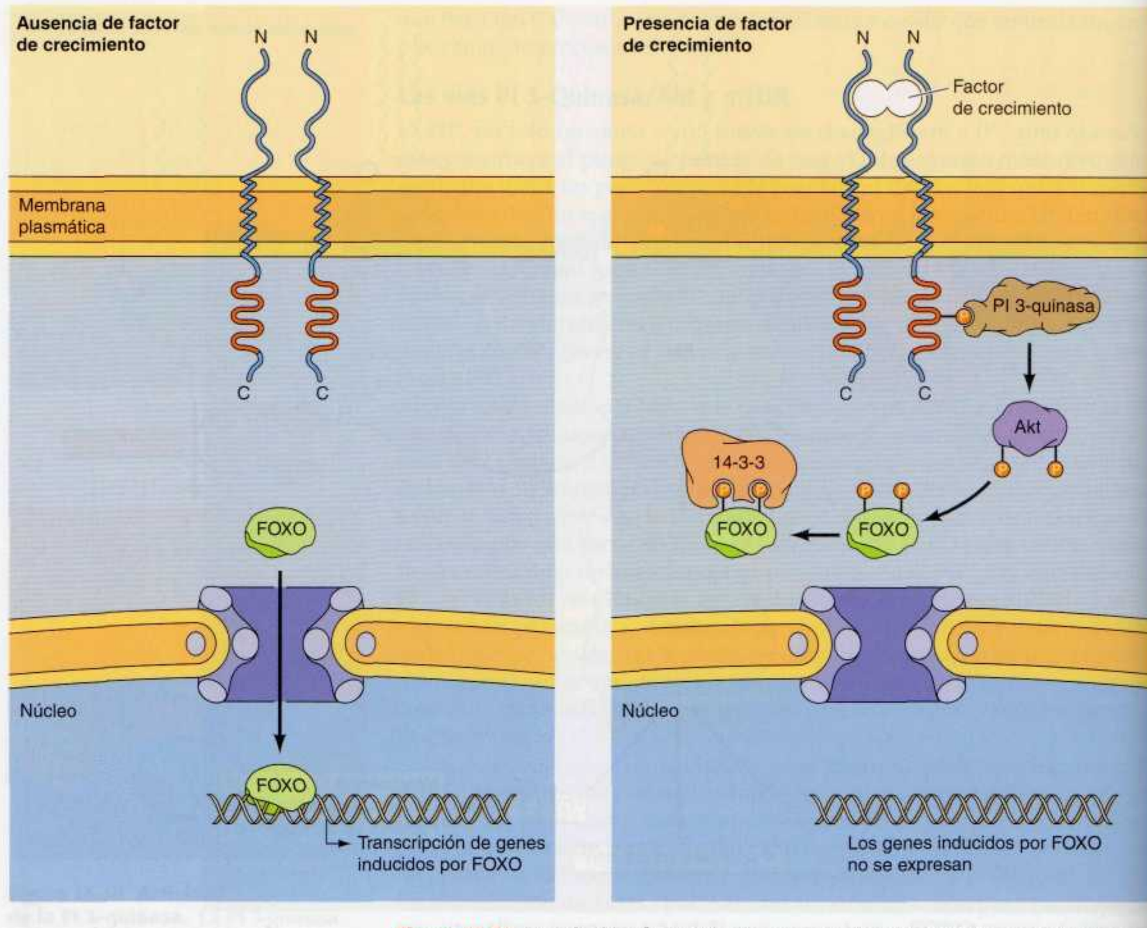


Figura 15.32 Regulación de FOXO. En ausencia de estimulación por factores de crecimiento, el factor de transcripción FOXO se transloca al núcleo e induce la expresión del gen diana. La estimulación por factores de crecimiento da lugar a la activación de Akt, que fosforila a FOXO. Esto crea sitios de unión para la chaperona citosólica 14-3-3, que secuestra a FOXO en una forma inactiva en el citoplasma.

■ **La rapamicina, un antibiótico producido por ciertos hongos, es un inhibidor específico del complejo mTORC1 y es empleado como medicamento inmunosupresor en los trasplantes de órganos.**

Vía de las quinasas MAP

La vía de las quinasas MAP se refiere a una cascada de proteína quinasas que está altamente conservada en la evolución y desempeña un papel central en la transducción de señales en todas las células eucariotas, desde las levaduras hasta el ser humano. Los elementos centrales de esta vía son una familia de proteína-serina/treonina quinasas denominadas **quinasas MAP** (de *p*roteína quinasas *a*ctivadas por *m*itógenos) que se activan en respuesta a diversos factores de crecimiento y a otras moléculas señal. En las levaduras, las vías de las quinasas MAP controlan diversas respuestas celulares, entre las que se incluyen el apareamiento, la forma celular y la esporulación. En los eucariotas superiores (incluyendo *C. elegans*, *Drosophila*, ranas y mamíferos) las quinasas MAP son reguladores ubicuos del crecimiento y de la diferenciación celular.

Las formas mejor caracterizadas de las quinasas MAP en las células de mamíferos pertenecen a la familia de las **ERK** (*q*uinasas *r*eguladas por seña-

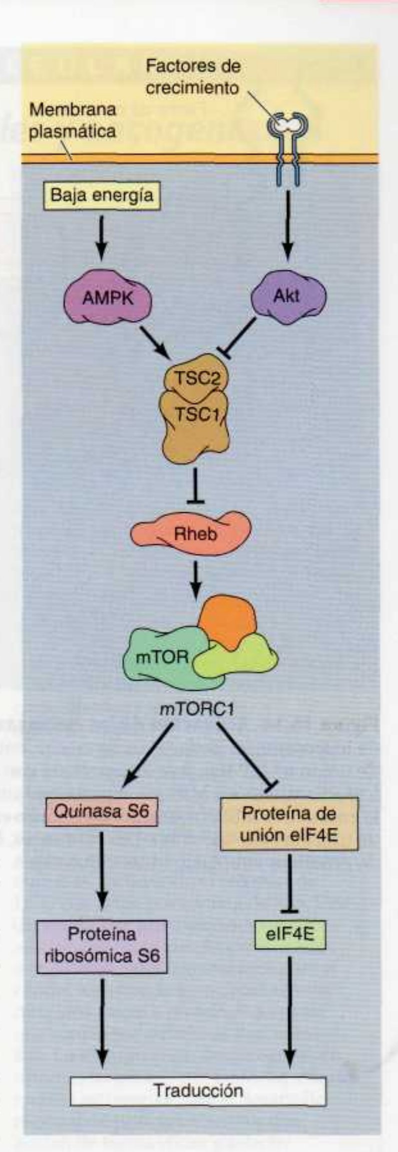


Figura 15.33 La vía mTOR. La proteína quinasa mTORC1 es activada por Rheb, que es inhibido por el complejo TSC1/2. Akt inhibe TSC1/2, dando lugar a la activación de Rheb y mTORC1 en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento. Por el contrario, AMPK activa a TSC1/2, dando lugar a la inhibición de Rheb y mTORC1 si las reservas de energía celular están agotadas. mTORC1 estimula la traducción mediante la fosforilación de la quinasa S6 (que fosforila la proteína ribosómica S6) y mediante la fosforilación de la proteína de unión a eIF4E, eliminando la inhibición del factor de iniciación de la traducción eIF4E.

les extracelulares). La activación de ERK desempeña un papel central en la señalización de la proliferación celular inducida por factores de crecimiento que actúan a través de proteína-tirosina quinasas o de receptores asociados a proteínas G. La proteína quinasa C también puede activar la vía ERK y tanto la vía de Ca^{2+} como la de AMPc presentan intersecciones con la señalización vía ERK, bien activando o bien inhibiendo la vía de ERK en función del tipo celular.

La activación de ERK tiene lugar a través de dos proteína quinasas anteriores que están asociadas a receptores de factores de crecimiento mediante una proteína de unión a GTP denominada **Ras** (Fig. 15.34). La activación de Ras provoca la activación de la proteína-serina/treonina quinasa **Raf**, la cual fosforila y activa una segunda proteína quinasa denominada **MEK** (de MAP quinasa/*E*RK *q*uinasa). MEK es una proteína quinasa con especificidad doble, que activa a miembros de la familia ERK fosforilando tanto residuos de treonina como de tirosina separados por un aminoácido (p. ej., treonina-183 y tirosina-185 de ERK2). Una vez activada, ERK fosforila diversidad de dianas, incluyendo otras proteína quinasas y factores de transcripción.

El papel central de la vía de la ERK en las células de mamíferos se descubrió a partir de los estudios acerca de las proteínas Ras, que se identificaron por primera vez como proteínas oncogénicas de virus tumorales que causaban sarcomas en ratas (de ahí el nombre Ras, de virus de sarcoma de *ra*tas). El interés acerca de Ras creció considerablemente en 1982, cuando se implicaron por primera vez las mutaciones en el gen *ras* con el desarrollo de cánceres humanos (lo que se tratará en el Cap. 18). La importancia de Ras en la señalización intracelular se puso de manifiesto mediante experimentos en los que se mostraba que la microinyección de la proteína Ras activa inducía la proliferación de las células sanas de mamíferos. Por otro lado, la interferencia con la función de Ras, bien por la microinyección de anticuerpos anti-Ras, o bien por la expresión de un mutante Ras negativo dominante, bloqueaba la proliferación celular inducida por factores de crecimiento. Así, Ras no es solamente capaz de inducir el crecimiento anormal característico de las células cancerosas, sino que parece ser que se requiere en la respuesta de las células normales a la estimulación por los factores de crecimiento.

Las proteínas Ras son proteínas de unión de nucleótidos de guanina que funcionan de manera análoga a las subunidades α de las proteínas G, alternando entre la forma activa unida al GTP y la forma inactiva unida al GDP (Fig. 15.35). Sin embargo, a diferencia de las subunidades α de las proteínas G, Ras actúa como un monómero en vez de unirse a las subunidades $\beta\gamma$. La activación de Ras está mediada por **factores de intercambio de nucleótidos de guanina**, que inducen la liberación del GDP unido y su intercambio por el GTP. El complejo Ras-GTP se inactiva por la hidrólisis del GTP, estimulada por la interacción de Ras-GTP con **proteínas activadoras de la GTPasa**. Es interesante destacar que las mutaciones de los genes *ras* en los cánceres humanos tienen como efecto la inhibición de la hidrólisis del GTP por las proteínas Ras. Por tanto, estas proteínas Ras mutantes permanecen conti-

Figura 15.34 Activación de las quinasas MAP ERK. La estimulación de los receptores de factores de crecimiento activa la pequeña proteína de unión a GTP Ras, que interacciona con la proteína quinasa Raf. Raf fosforila y activa a MEK, una proteína quinasa con doble especificidad, la cual activa a ERK fosforilándola tanto en residuos de treonina como de tirosina (Thr-183 y Tyr-185). Entonces, ERK fosforila a diversidad de proteínas citoplasmáticas y nucleares.

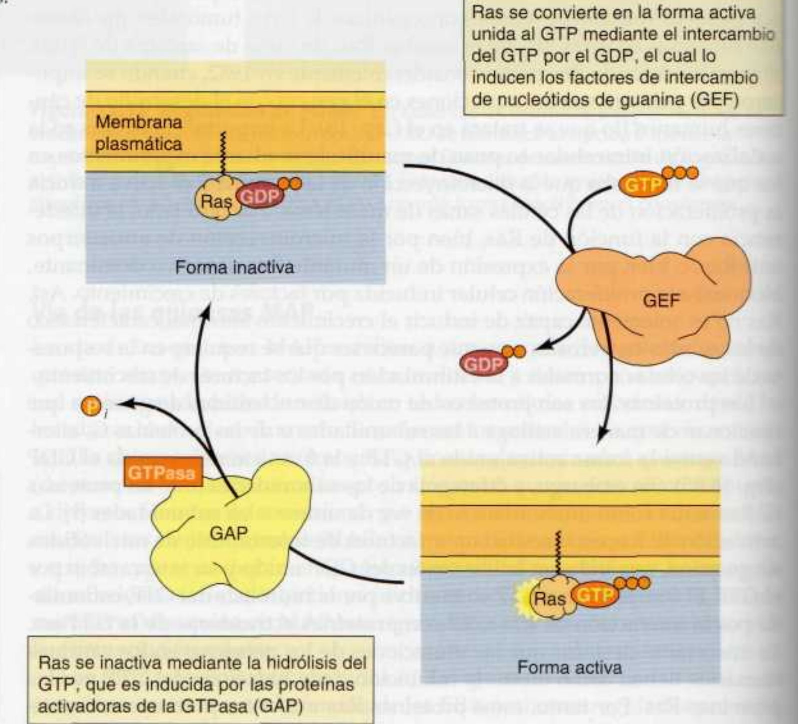


Figura 15.35 Regulación de las proteínas Ras. Las proteínas Ras alternan entre los estados inactivo, unidas al GDP, y activo, unidas al GTP.



MEDICINA MOLECULAR

Cáncer, transducción de señales y oncogenes ras

Enfermedad

El cáncer acaba con la vida de, aproximadamente, uno de cada cuatro americanos, contabilizándose 550.000 muertes al año en Estados Unidos. Hay más de 100 tipos de cáncer diferentes pero algunos son más comunes que otros. En este país, los cánceres letales más frecuentes son los de pulmón y colon que suman el 40% de las muertes totales por cáncer. Otros contribuyentes a la mortalidad por cáncer incluyen al cáncer de mama, próstata y páncreas, responsables aproximadamente del 7,3%, 6,0% y 4,8%, respectivamente, de las muertes por cáncer en Estados Unidos.

La característica común de todos los cánceres es la proliferación incontrolada de las células cancerosas, que acaban diseminándose por todo el organismo, invadiendo los órganos y tejidos sanos, lo que lleva a la muerte del paciente. La cirugía y la radioterapia son tratamientos eficaces para aquellos cánceres que están localizados, pero no alcanzan a aquellas células cancerosas que se han diseminado a zonas distantes en el organismo. Por tanto, el tratamiento de estos cánceres requiere de la quimioterapia. Por desgracia, los agentes quimioterapéuticos disponibles en la actualidad no actúan específicamente sobre las células cancerosas. La mayoría de ellos dañan el ADN o interfieren con la síntesis del ADN, por lo que también acaban con aquellas células sanas que tengan gran capacidad de división, como son las células epiteliales de la superficie del tracto digestivo y las células hematopoyéticas de la médula ósea. La toxicidad de estos medicamentos limita su efectividad, y muchos cánceres no se eliminan mediante aquellas dosis de quimioterapia que el paciente pueda tolerar. Por tanto, aunque se ha avanzado mucho en el tratamiento del cáncer, casi la mitad de los pacientes a los que se diagnostica un cáncer acaban muriendo de dicha enfermedad.

Bases moleculares y celulares

La identificación de los genes virales que convierten a las células normales en células cancerosas, como el gen *src* virus del sarcoma de Rous, demostró por primera vez que los cánceres pueden ser causados por la acción de genes específicos (oncogenes). A partir del descubrimiento de que los oncogenes virales están relacionados con genes de las células sanas, se postuló la hipótesis de que los cánceres no inducidos por virus (que incluyen a la mayoría de los cánceres humanos) se deben a mutaciones en los genes de la célula sana, lo que da lugar a oncogenes de origen celular en vez de origen vírico. Estos oncogenes celulares se identificaron en los cánceres humanos en 1981. Seguidamente, se descubrió que los oncogenes humanos del cáncer de vesícula, pulmón y colon, estaban relacionados con los genes *ras*, previamente identificados en los virus causantes de sarcoma en ratas.

Aunque ahora se conocen muchos genes diferentes que desempeñan un papel importante en el desarrollo del cáncer, las mutaciones en los genes *ras* siguen siendo una de las alteraciones genéticas más comunes en los tumores humanos. Los oncogenes *ras* mutados se encuentran, aproximadamente, en el 25% de todos los cánceres humanos, incluyendo el 25% de cánceres de pulmón, el 50% de cánceres de colon y más del 90% de los cánceres de páncreas. Más aún, la acción de los oncogenes *ras* relaciona claramente el desarrollo del cáncer en el hombre con las alteraciones en las vías de señalización que regulan la proliferación celular. Las mutaciones que convierten a los genes *ras* en oncogenes causan la disminución de la hidrólisis del GTP por las proteínas Ras. Por consiguiente, las proteínas oncogénicas Ras mutadas permanecen en su forma activa, unida al GTP, en vez de alternar entre la forma activa e inactiva en respuesta a las señales extracelulares. Por tanto, las proteínas oncogénicas Ras están estimulando continuamente la vía de las quinasas ERK, lo que supone una proliferación celular continuada incluso en ausencia de aquellos factores de crecimiento necesarios para activar Ras y las demás señales intracelulares.

Prevención y tratamiento

El descubrimiento de oncogenes mutados en los cánceres humanos, lleva consigo la posibilidad de diseñar drogas dirigidas específicamente contra las proteínas oncogénicas. En principio, estas drogas podrían actuar selectivamente contra las células cancerosas, resultando menos tóxicas sobre las células normales que los agentes quimioterapéuticos convencionales. Debido a que *ras* se encuentra mutado con frecuencia en los cánceres humanos, las proteínas Ras han suscitado mucho interés como dianas potenciales de medicamentos.



Un pólipo de colon humano (un estadio temprano del cáncer de colon). Los oncogenes *ras* contribuyen al desarrollo de aproximadamente la mitad de todos los cánceres de colon. (E. P. Ewing, Jr., Centers for Disease Control.)

Como se analiza en el Capítulo 18, los medicamentos eficaces que se dirigen selectivamente frente a las células cancerosas han sido desarrollados recientemente frente a algunos oncogenes de proteína-tirosina quinasas, incluyendo el receptor de EGF, que actúa por encima de Ras. Una diversidad de principios activos adicionales están siendo investigados como potenciales tratamientos para el cáncer, incluyendo principios activos dirigidos frente a proteínas quinasas que actúan por debajo de Ras, como Raf. La identificación de oncogenes en tumores humanos, por tanto, ha abierto nuevas estrategias para el desarrollo racional de principios activos que actúan de forma eficaz y selectiv a frente a las células cancerosas humanas actuando sobre vías de señalización responsables del desarrollo del cáncer.

Referencias

Der, C. J., T. G. Krontiris and G. M. Cooper. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3637–3640.

Parada, L. F., C. J. Tabin, C. Shih and R. A. Weinberg. 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 297: 474–478.

nuamente en la forma activa unida al GTP, dando lugar a la proliferación incontrolada de las células cancerosas aun en ausencia de la estimulación por factores de crecimiento.

Las proteínas Ras son proteínas tipo de una gran familia de, aproximadamente, 50 proteínas relacionadas, denominadas proteínas pequeñas de unión a GTP, porque el tamaño de Ras y de las otras proteínas es la mitad que el de la subunidad α de las proteínas G. Un miembro de esta familia es Rheb, que regula la señalización mediada por mTOR (véase Fig. 15.33). Otras subfamilias de las proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP controlan una amplia gama de actividades celulares. Por ejemplo, la mayor subfamilia de proteínas pequeñas de unión a GTP (las proteínas Rab) regulan el tráfico de vesículas, como se vio en el Capítulo 10. Otras proteínas pequeñas de unión a GTP están involucradas en el transporte de proteínas al núcleo (la proteína Ran mencionada en el Cap. 9) y en la organización del citoesqueleto (la subfamilia Rho, como se verá más adelante en este capítulo).

El mecanismo de activación de Ras mejor comprendido es el mediado por los receptores proteína-tirosina quinasas (Fig. 15.36). La autofosforilación de estos receptores hace que se asocien con factores de intercambio de nucleótidos de guanina de Ras, a través de proteínas con dominios SH2. Un ejemplo bien caracterizado lo proporciona el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Sos, que se une a la proteína Grb2 en el citosol de las células no estimuladas, a través del dominio SH2 de esta última. La fosforilación de las tirosinas de los receptores (o de otras proteínas asociadas a los receptores) genera un sitio de unión para los dominios SH2 de las proteínas Grb2. La unión de Grb2 con el receptor activado, coloca a Sos en la membrana plasmática, donde interacciona con las proteínas Ras, que están unidas a la cara interna de la membrana a través de lípidos unidos al C terminal de Ras (véase Fig. 13.11). Sos, entonces, induce el intercambio de nucleótidos de guanina, lo que genera el complejo activo Ras-GTP. En la forma activa unida a GTP, Ras interacciona con varias proteínas efectoras, entre las que se encuentra la proteína-serina/treonina quinasa Raf. Esta inter-

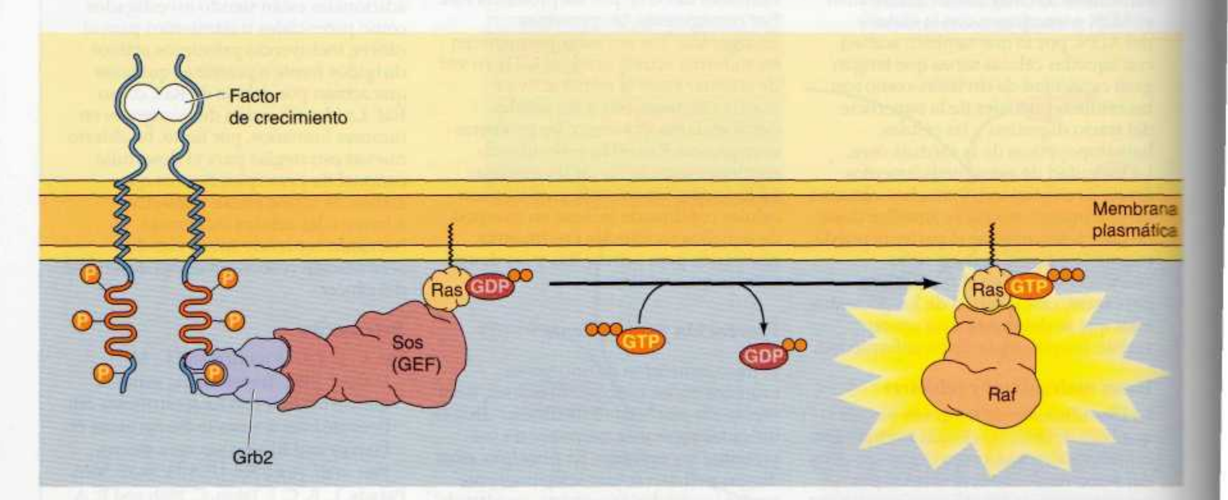


Figura 15.36 Activación de Ras posterior (*downstream*) a los receptores proteína-tirosina quinasas. El complejo formado por Grb2 y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Sos, se une a una secuencia de fosfotirosinas en el receptor, a través del dominio SH2 de Grb2. Esta interacción lleva a Sos a la membrana plasmática, donde inducirá el intercambio de GDP/GTP en Ras. Entonces, el complejo Ras-GTP activo se unirá a la proteína quinasa Raf.

acción con Ras hace que Raf pase de estar situado en el citosol a localizarse en la membrana plasmática e inicia la activación de Raf, en la que Raf se activa mediante fosforilación.

Como ya se indicó, la activación de Raf inicia una cascada de proteína quinasas que conduce a la activación de ERK. Entonces, ERK fosforila a diversas proteínas diana incluyendo a otras proteína quinasas. Adicionalmente, ERK regula la vía mTORC1 mediante la fosforilación de TSC1/2 (véase Fig. 15.33). Es importante destacar que una fracción de ERK activado se transloca al núcleo donde regula factores de transcripción mediante fosforilación (Fig. 15.37). En cuanto a esto, es importante señalar que, una primera respuesta a la estimulación por factores de crecimiento es la inducción rápida de la transcripción de una familia de, aproximadamente, 100 genes denominados **genes tempranos inmediatos**. La inducción de determinados genes tempranos inmediatos está mediada por una secuencia reguladora, denominada elemento de **respuesta al suero (SRE)**, que es reconocida por un complejo de factores de transcripción entre los que se incluye el **factor de respuesta al suero (SRF)** y **Elk-1**. ERK fosforila y activa a Elk-1, lo que proporciona un enlace directo entre la familia ERK de quinasas MAP y la inducción de genes tempranos inmediatos. Muchos genes tempranos inmediatos codifican factores de transcripción, por lo que su inducción en respuesta a factores de crecimiento altera la expresión de otra batería de genes posteriores denominados **genes de respuesta secundaria**. Como se detalla en el Capítulo 16, estas alteraciones de la expresión génica asocian directamente la señalización vía ERK con la estimulación de la proliferación celular inducida por factores de crecimiento.

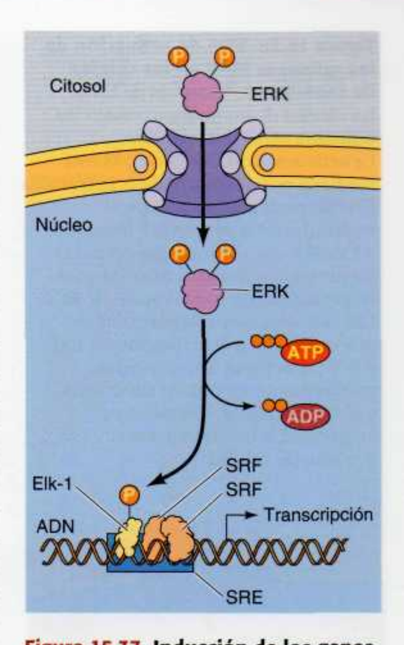
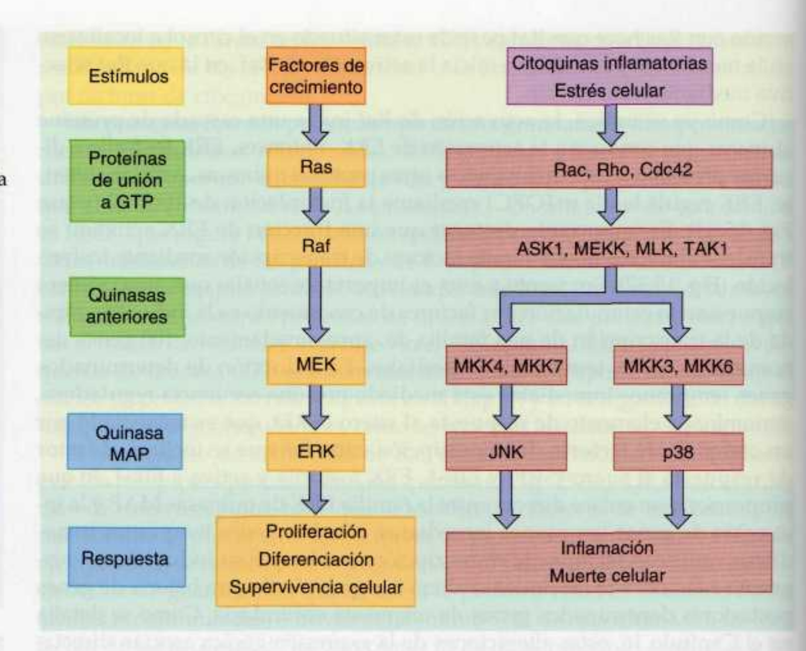


Figura 15.37 Inducción de los genes tempranos inmediatos por ERK. La ERK activada se transloca al núcleo, donde fosforila al factor de transcripción Elk-1. Elk-1 se une al elemento de respuesta al suero (SRE) formando un complejo con el factor de respuesta al suero (SRF). La fosforilación estimula la actividad de Elk-1 como activador de la transcripción, induciendo a los genes tempranos inmediatos.

Tanto las levaduras como las células de mamífero tienen múltiples vías de quinasas MAP que controlan respuestas celulares distintas. Cada cascada está constituida por tres proteína quinasas: una quinasa MAP terminal y dos quinasas anteriores (análogas a Raf y MEK) que regulan su actividad. En la levadura *S. cerevisiae*, son cinco las cascadas diferentes de quinasas MAP que regulan el apareamiento, la esporulación, la generación de filamentos, el remodelado de la pared celular y la respuesta a una elevada osmolaridad. En las células de mamíferos se han identificado tres grupos principales de quinasas MAP. Además de los miembros de la familia ERK, se diferencian las quinasas MAP JNK y p38 que se activan preferentemente en respuesta a las citoquinas inflamatorias y al estrés celular (p. ej., la radiación ultravioleta) (Fig. 15.38). Las cascadas de JNK y quinasa MAP p38 son activadas por acción de proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP de la subfamilia Rho (incluidas Rac, Rho y Cdc42) en lugar de por Ras. Mientras que la señalización por ERK conduce principalmente a la supervivencia, diferenciación o proliferación celular, las vías de las quinasas MAP JNK y p38 llevan a la inflamación y a la muerte celular. Al igual que ERK, las MAP quinasas JNK y p38 pueden translocarse al núcleo y fosforilar factores de transcripción que regulan la expresión génica. Por tanto, en todos los tipos de células eucariotas actúan múltiples vías de quinasas MAP que controlan las respuestas celulares a las diversas señales ambientales.

La especificidad de la señalización de las MAP quinasas se mantiene, al menos en parte, gracias a la organización de los componentes de cada cascada de MAP quinasas en complejos que están asociados con **proteínas *scaffold*** (andamio, en inglés). Por ejemplo, la proteína *scaffold* KSR organiza a la ERK y sus factores activadores situados corriente arriba Raf y MEK en un complejo de señalización (Fig. 15.39). Como resultado de la asociación específica de estas proteínas quinasa sobre KSR, la activación de Raf por parte de Rac da lugar a la activación específica y eficaz de MEK, que a su vez activa a ERK. Tras la fosforilación de MEK, ERK se disocia de KSR y puede traslocarse al núcleo (véase Fig. 15.37). Diferentes proteínas *scaffold* están

Figura 15.38 Vías de activación de las quinasas MAP en las células de mamíferos. Además de ERK, las células de mamíferos poseen las quinasas MAP JNK y p38. La activación de JNK y de p38 está mediada por miembros de la subfamilia Rho de proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP (Rac, Rho y Cdc42), que estimula las cascadas de proteína quinasas paralelas a las responsables de la activación de ERK. Las cascadas de proteína quinasas que conducen a la activación de JNK y p38 parece que son activadas preferentemente por las citoquinas y el estrés celular, y conducen, en general, a la inflamación o a la muerte celular.



implicadas no sólo en la organización de otros complejos de señalización de MAP quinasas, sino también en la asociación de otras moléculas señalizadoras con sus receptores y dianas. La asociación física de los componentes de la vía de señalización, como resultado de la interacción con las proteínas *scaffold*, se cree que desempeña un papel importante en la determinación de la especificidad de las vías de señalización en el interior celular.

■ **La hormona de crecimiento funciona activando la vía JAK/STAT.**

Vías JAK/STAT y TGF-β/Smad

Las vías de la PI 3 quinasa y de las quinasas MAP son ejemplos de conexiones indirectas entre la superficie celular y el núcleo, en los que una cascada de quinasas proteicas, en última instancia, da lugar a la fosforilación de factores de transcripción. Las vías JAK/STAT y TGF-β/Smad ilustran conexiones más directas entre receptores de factores de crecimiento y factores de transcripción, en los que los factores de transcripción diana son fosforilados directamente mediante quinasas asociadas a receptores.

Los elementos clave de esta **vía JAK/STAT** son las **proteínas STAT** (*t*ransductores de señal y *a*ctivadores de *t*ranscripción) que se identificaron originalmente al estudiar la señalización de los receptores de citoquinas (Fig. 15.40). Las proteínas STAT son una familia de factores de transcripción que contienen dominios SH2. Son inactivos en aquellas células que no hayan sido estimuladas, localizándose en el citoplasma. Al estimularse el receptor de citoquinas, las proteínas STAT se agrupan y se unen, a través de los dominios SH2, al dominio citoplasmático de los polipéptidos receptores, concretamente a las secuencias con fosfotirosinas. Tras su unión a los receptores activados, las proteínas STAT son fosforiladas por miembros de la familia JAK de las proteína-tirosina quinasas no receptoras, que se unen a los

Figura 15.39 Una proteína *scaffold* para la quinasa de la MAP quinasa JNK. La proteína *scaffold* KSR se une a Raf, MEK y ERK, organizando estos componentes de la vía MAP quinasa de ERK en un complejo de señalización.

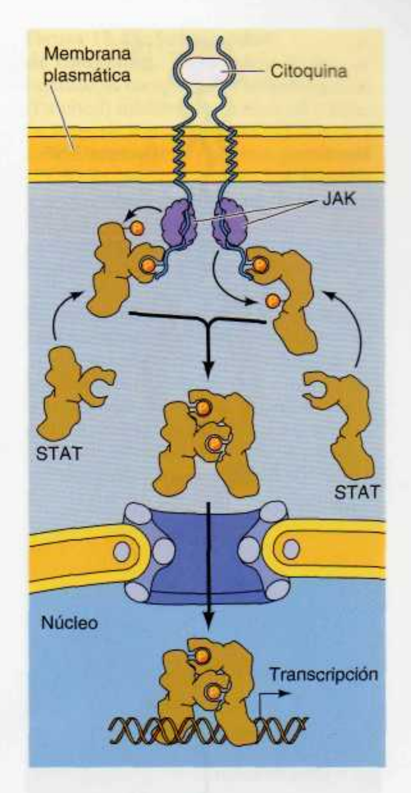


Figura 15.40 Vía JAK/STAT. Las proteínas STAT son factores de transcripción con dominios SH2, a través de los cuales se unen a aquellas secuencias que contengan fosfotirosina. En las células no estimuladas, las proteínas STAT se encuentran inactivas en el citosol. La estimulación de los receptores de citoquinas provoca que a estos se unan las proteínas STAT, siendo entonces fosforiladas por las proteína-tirosina quinasas JAK, asociadas al receptor. Las proteínas STAT fosforiladas se dimerizan y se translocan al núcleo, donde activan la transcripción de los genes diana.

receptores de las citoquinas. La fosforilación de las tirosinas induce la dimerización de las proteínas STAT, las cuales se translocan al núcleo, donde activan la transcripción de sus genes diana.

Estudios posteriores han demostrado que las proteínas STAT también son activadas más allá de los receptores proteína-tirosina quinasas, de tal manera que su fosforilación puede ser catalizada por los mismos receptores o por quinasas asociadas no receptoras. Por tanto, los factores de transcripción STAT actúan como un vínculo directo entre las citoquinas y los receptores de los factores de crecimiento en la superficie de la célula por un lado, y la regulación de la expresión génica en el núcleo por el otro.

Los receptores de miembros de la familia de factores de crecimiento TGF-β son proteína-serina/treonina quinasas, que fosforilan directamente factores de transcripción de la familia **Smad** (Fig. 15.41). Los receptores están compuestos por polipéptidos de tipo I y II, que se asocian después de la unión del ligando. El receptor de tipo II a continuación fosforila al receptor de tipo I, que a su vez fosforila a una proteína Smad. Las Smad fosforiladas forman complejos y se translocan al núcleo y regulan la expresión génica. Debería tenerse en cuenta que existen al menos 30 miembros diferentes de la familia TGF-β en el hombre, que generan diferentes respuestas en sus células diana. Esto se consigue mediante las interacciones combinatorias de siete receptores de tipo I diferentes y cinco receptores de tipo II, que generan la activación de diferentes miembros de la familia Smad (un total de ocho miembros).

Señalización vía NF-κB

La señalización vía NF-κB es otro ejemplo de una vía de señalización que tiene como diana directamente una familia específica de factores de transcripción. La familia **NF-κB** consiste en cinco factores de transcripción que juegan papeles clave en el sistema inmune y en la inflamación, además de en la regulación de la proliferación y supervivencia de múltiples tipos de células animales. Miembros de esta familia de factores de transcripción se activan en respuesta a una diversidad de estímulos, incluidos citoquinas, factores de crecimiento, bacterianas e infección viral y lesiones del ADN.

Se conocen muy bien las rutas de señalización que producen la activación de NF-κB a partir del receptor del **factor de necrosis tumoral** (una citoquina que induce procesos de inflamación y muerte celular) y de los **receptores tipo Toll**, los cuales reconocen diversas moléculas asociadas a bacterias y virus patógenos. En células sin estimular las proteínas NF-κB se encuentran unidas a proteínas inhibitorias **IκB** que mantienen a las NF-κB

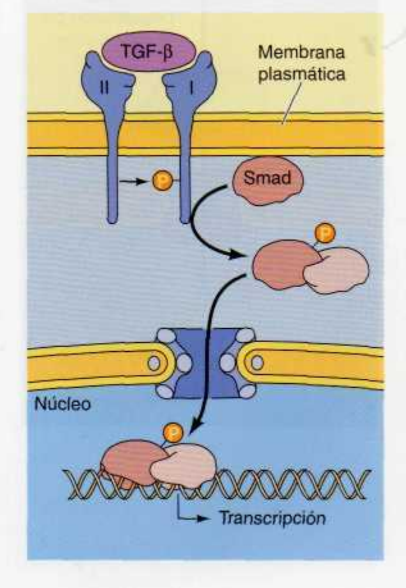


Figura 15.41 Señalización desde receptores de TGF-β. Los receptores de TGF-β son dímeros de polipéptidos de tipo I y II. El receptor de tipo II fosforila y activa al tipo I, que a su vez fosforila a una proteína Smad. Las Smad fosforiladas forman complejos y se translocan al núcleo para la transcripción de los genes diana.

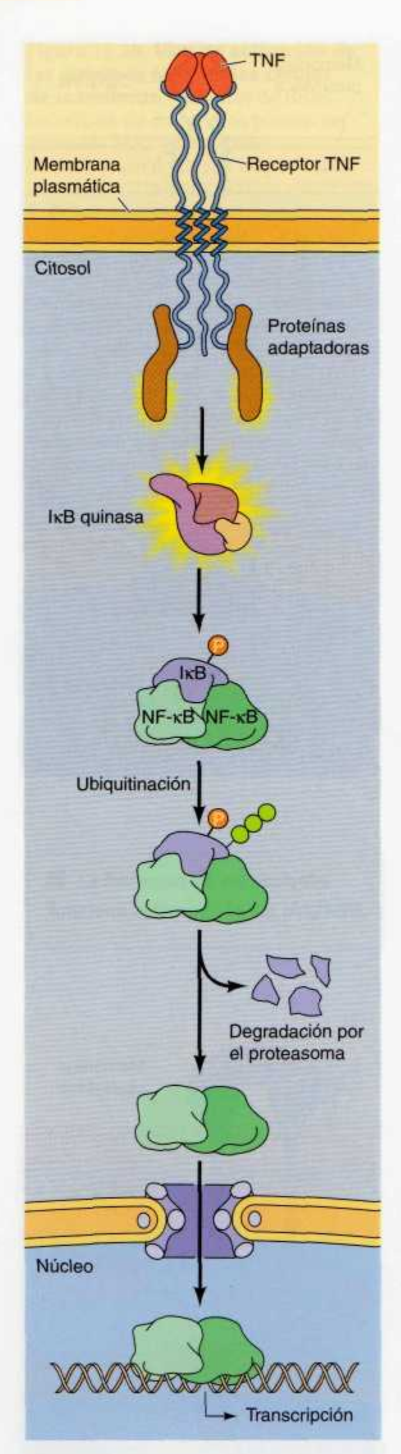


Figura 15.42 Señalización de NF-κB desde el receptor de TNF. En su estado inactivo, homo- y heterodímeros de NF-κB pueden encontrarse unidos a IκB en el citoplasma. La activación del receptor de TNF (formado por tres cadenas polipeptídicas) induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras que activan la IκB quinasa. Esta fosforilación marca a IκB para su ubiquitinación y degradación por el proteasoma, permitiendo que NF-κB se transloque al núcleo y active la transcripción de sus genes diana.

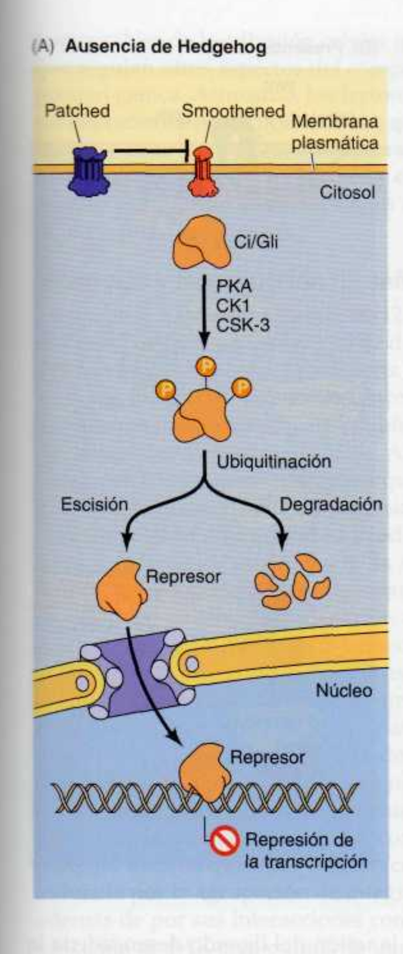
en estado inactivo en el citosol (Fig. 15.42). La activación de los receptores del TNF y los receptores tipo Toll inducen el reclutamiento de proteínas adaptadoras que activan la IκB quinasa, que a su vez fosforila a IκB. Esta fosforilación dirige a IκB hacia su ubiquitinación y degradación por el proteasoma, liberando a NF-κB para translocarse al núcleo e inducir la expresión de sus genes diana.

Vías Hedgehog, Wnt y Notch

Las vías **Hedgehog** y **Wnt** son sistemas de señalización estrechamente conectadas, que juegan papeles clave en la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario. Ambas vías Hedgehog y Wnt fueron descritas en primer lugar en *Drosophila*, pero se ha visto que miembros de ambas familias controlan una amplia gama de eventos durante el desarrollo tanto de embriones vertebrados como invertebrados. Ejemplos de procesos regulados por estas vías de señalización incluyen la determinación de tipos celulares y el establecimiento de patrones durante el desarrollo de miembros, el sistema nervioso, el esqueleto, pulmones, pelo, dientes y gónadas. Por otra parte, las vías Hedgehog y Wnt juegan unos papeles clave en la regulación de la proliferación de las células progenitoras en los tejidos adultos (véase Cap. 17).

Los genes *hedgehog* (uno en *Drosophila* y tres en mamíferos) codifican proteínas secretadas que son modificadas mediante la adición de lípidos que desempeñan una destacada función en la regulación del tráfico y distribución de Hedgehog. El receptor de Hedgehog es una proteína transmembrana (Patched) que inhibe a otra proteína transmembrana (Smoothened) mediante un mecanismo desconocido (Fig. 15.43). La unión de Hedgehog inhibe a Patched, lo que induce la activación de Smoothened, la cual pone en marcha una vía de señalización que conduce a la activación de un factor de transcripción denominado Ci en *Drosophila* o Gli en mamíferos. Cuando Smoothened no está activada, una serie de proteína quinasas, como proteína quinasa A, caseína quinasa-1 y GSK-3, fosforilan a las proteínas Ci/Gli, que pueden degradarse o dar lugar a fragmentos que actuarán como represores. La vía de señalización de Smoothened inhibe la fosforilación y ulterior degradación/escisión de las proteínas Ci/Gli, que actúan como activadores de la transcripción. No obstante, no se conocen bien los acontecimientos moleculares que suceden corriente abajo de Smoothened y es posible que difieran en *Drosophila* y mamíferos, por lo que aún queda mucho por aprender acerca de esta importante vía de señalización.

Las proteínas Wnt son una familia de factores de crecimiento secretados que se unen a un complejo de receptores de las familias Frizzled y LRP (Fig. 15.44). Las señales de Frizzled y LRP producen la estabilización de la β-catenina, la cual actúa como activador transcripcional en la vía Wnt. En ausencia de señales en esta vía, un complejo formado por la caseína quinasa-1 y GSK-3 con las proteínas axina y APC fosforilan a la β-catenina. De manera similar a la fosforilación de las proteínas Ci/Gli, la fosforilación de la β-catenina estimula su ubiquitinación y degradación. La unión de Wnt induce la fosforilación de Dishevelled (una proteína citoplasmática que



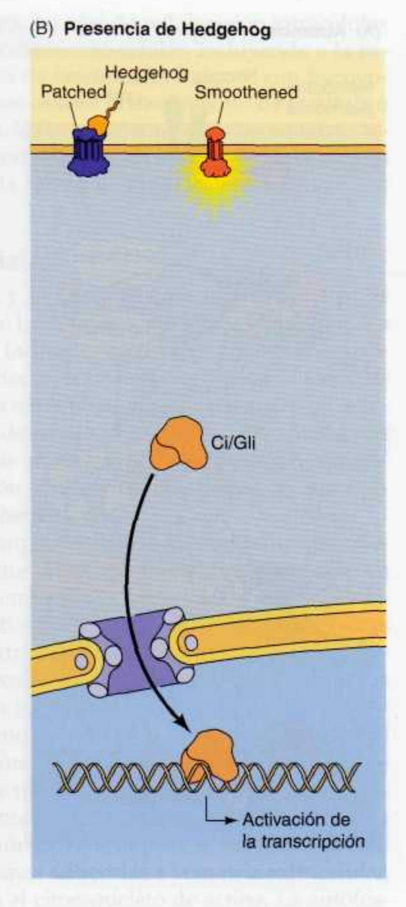
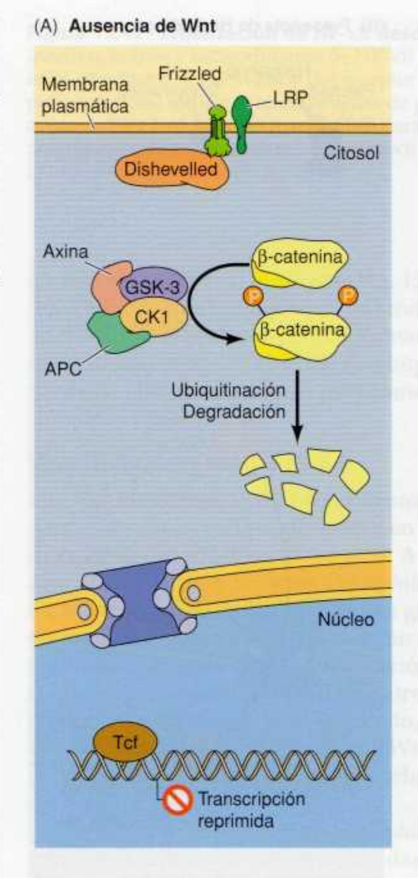


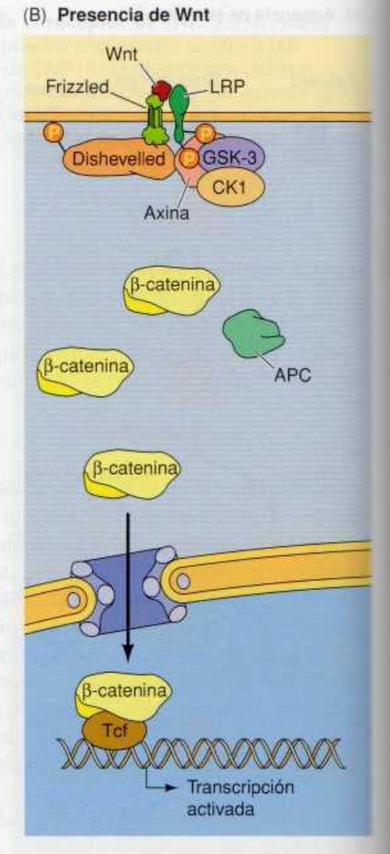
Figura 15.43 Señalización de Hedgehog. En ausencia de su ligando, el receptor de Hedgehog (Patched) inhibe a Smoothened y los factores de transcripción Ci/Gli son fosforilados por la proteína quinasa A (PKA), la caseína quinasa-1 (CK1) y la quinasa-3 de la glicógeno sintasa (GSK-3). Las proteínas Ci/Gli fosforiladas se ubiquitinan para ser degradadas o escindidas en fragmentos de actividad represora. La unión del polipéptido Hedgehog inhibe a Patched, lo que induce la activación de Smoothened. Este acontecimiento inhibe la fosforilación y la degradación de las proteínas Ci/Gli, que se translocan al núcleo y actúan como activadores transcripcionales de sus genes diana.

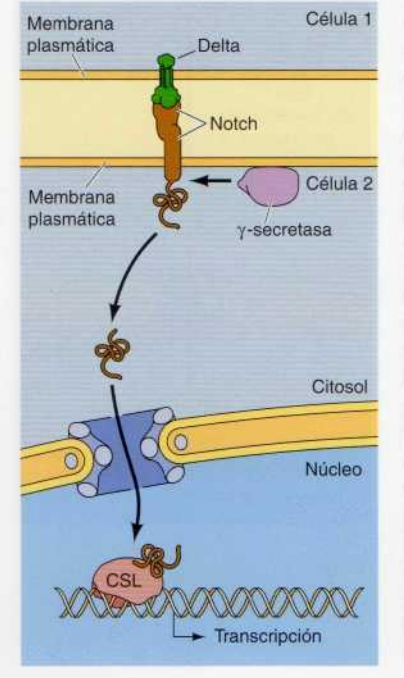
interacciona con Frizzled), lo que induce, a su vez, la fosforilación de LRP. Se crean, así, sitios de unión para axina, que se asocia al receptor y se disocia del complejo formado por la axina, la caseína quinasa-1 y GSK-3 con la β-catenina. La disociación de este complejo impide la degradación de la β-catenina, lo que da lugar a un aumento de sus concentraciones. Como se comentó en el Capítulo 14, la β-catenina es una proteína transmembrana que une las cadherinas con la actina en las uniones adherentes (véase Fig. 14.23). Cabe destacar que la unión de las cadherinas con la actina tan solo constituye una de las funciones de la β-catenina. En la vía de señalización de Wnt, la β-catenina regula directamente la expresión génica a través de la formación de un complejo con la familia Tcf de factores de transcripción. En ausencia de β-catenina, estos factores ejercen una acción represora, mientras que al asociarse con esta molécula actúan como activadores que inducen la expresión de genes diana que codifican otras moléculas de señalización celular y diversos factores de transcripción que controlan el destino de la célula.

La vía **Notch** es otra vía de señalización altamente conservada que controla el destino celular durante el desarrollo animal. La señalización vía Notch es un ejemplo de interacciones directas célula-célula durante el desarrollo. Notch es una proteína grande con un solo dominio transmembrana que actúa como un receptor de señalización por proteínas transmembrana (por ejemplo, Delta) presentes en la superficie de células adyacentes (Fig. 15.45). La estimulación de Notch inicia una nueva vía directa de acti-

Figura 15.44 La vía de Wnt. En ausencia de Wnt, la caseína quinasa-1 (CK1) y GSK-3, asociadas a axina y APC, fosforilan a la β-catenina, que se ubiquitina y degrada. Los polipéptidos de Wnt se unen a los receptores de Frizzled y LRP e inducen la fosforilación de Dishevelled y LRP. De este modo se crean sitios de unión de la axina, que se disocia del complejo axina/APC/CK1/GSK3 y se estabiliza a la β-catenina. Esta molécula se transloca al núcleo para formar un complejo con los factores de transcripción Tcf, que pasarán de una actividad represora a otra activadora de los genes diana.







vación transcripcional. En particular, la unión del ligando desencadena la escisión proteolítica de Notch, y el dominio intracelular de Notch es entonces translocado al núcleo. El dominio intracelular de Notch interacciona a continuación con un factor de transcripción (denominado CSL en mamíferos) y le convierte de ser un represor en un activador de sus genes diana. Al igual que en la vía de señalización Wnt, los genes diana de Notch incluyen genes que codifican otras proteínas reguladoras de la transcripción, que actúan para determinar el destino celular.

Transducción de señales y citoesqueleto

Las secciones precedentes se han centrado en las vías de señalización que regulan variaciones en el metabolismo o en la expresión génica, en respuesta a las hormonas y a los factores de crecimiento. Sin embargo, las funciones de la mayoría de las células también están influidas directamente por la adhesión celular y por la organización del citoesqueleto. Así, los receptores

Figura 15.45 Señalización por Notch. Notch actúa como un receptor para la señalización directa célula-célula mediante proteínas transmembrana (por ejemplo, Delta) en la superficie de células vecinas. La unión de Delta desencadena la escisión proteolítica de Notch mediante la γ-secretasa. Esto libera el dominio intracelular de Notch, que se transloca al núcleo e interacciona con el factor de transcripción CSL para inducir la expresión génica.

responsables de la adhesión celular inician vías de señalización intracelular que regulan otros aspectos del comportamiento celular, incluyendo a la expresión génica. Asimismo, los factores de crecimiento inducen con frecuencia alteraciones en el citoesqueleto, que causan el movimiento de la célula o cambios en su forma. De esta manera, los componentes del citoesqueleto actúan igualmente como receptores y como dianas en las vías de señalización celular, integrando la variación en la forma y el movimiento celular con otras respuestas celulares.

Integrinas y transducción de señales

Como ya se trató en los Capítulos 12 y 14, las integrinas son los principales receptores responsables del anclaje de las células a la matriz extracelular. En dos tipos de uniones célula-matriz (adhesiones focales y hemidesmosomas), las integrinas también interaccionan con componentes del citoesqueleto, promoviendo un vínculo estable entre la matriz extracelular y las células adheridas (véase Fig. 14.20). Además de este papel estructural, las integrinas sirven como receptores que activan vías de señalización intracelular, por lo que controlan la expresión génica y otros aspectos del comportamiento celular en respuesta a la adhesión celular.

Al igual que los miembros de la superfamilia de los receptores de citoquinas, las integrinas tienen segmentos citoplasmáticos cortos que carecen de actividad enzimática alguna. Sin embargo, la fosforilación de las proteína-tirosinas es una respuesta inmediata a la interacción de las integrinas con los componentes de la matriz extracelular, lo que sugiere que las integrinas están asociadas a proteína-tirosina quinasas no receptoras. Una vía de señalización a partir de integrinas implica a la activación de una proteína-tirosina quinasa no receptora denominada **FAK** (*focal adhesion kinase*) (Fig. 15.46). Tal y como implica su nombre, FAK se localiza en las adhesiones focales y se fosforila rápidamente tras la unión de la integrina a componentes de la matriz extracelular, como la fibronectina. Al igual que otras proteína-tirosina quinasas, la activación de FAK implica la autofosforilación inducida por la agrupación de integrinas adheridas a la matriz extracelular, además de por sus interacciones con el citoesqueleto de actina. La autofosforilación de FAK crea puntos de interacción para otras moléculas señalizadoras que contengan dominios SH2, incluyendo miembros de la familia Src de proteína-tirosina quinasas no receptoras que fosforilan puntos adicionales de FAK. Como se ha visto previamente en el caso de los receptores de factores de crecimiento, la fosforilación en tirosinas de FAK crea sitios de unión para dominios SH2 de otras moléculas señalizadoras, incluyendo la fosfolipasa C-γ, PI 3-quinasa y el complejo Grb2-Sos. El reclutamiento del factor de intercambio de nucleótidos de guanina Sos desencadena la activación de Ras, que a su vez acopla a las integrinas a la activación de la vía ERK. Así, la activación de las proteína-tirosina quinasas FAK y Src por parte de las integrinas asocia la adhesión celular a las mismas vías de señalización que regulan la expresión génica, la proliferación celular y la supervivencia de la célula, que se activan en respuesta a los factores de crecimiento. Adicionalmente, las integrinas pueden interaccionar y estimular las actividades de receptores proteína-tirosina quinasa, como el receptor de EGF, dando lugar a la activación paralela de vías de señalización estimuladas por factores de crecimiento y por la adhesión celular.

Regulación del citoesqueleto de actina

La señalización desde las integrinas además de a partir de los receptores de factores de crecimiento también juega un papel central en el control del movimiento celular regulando el comportamiento dinámico del citoesqueleto de actina. Las respuestas celulares a los factores de crecimiento además de a

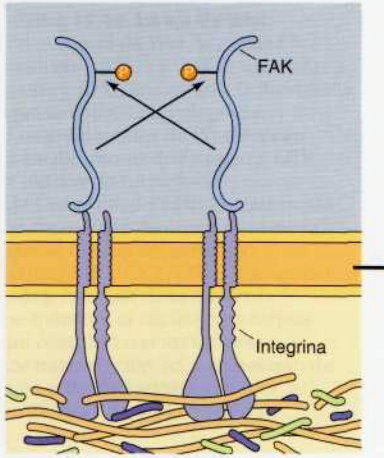


Figura 15.46 Señalización por integrinas. La unión de integrinas a la matriz extracelular da lugar al agrupamiento de integrinas y la activación de FAK por autofosforilación. A continuación, Src se une al dominio de autofosforilación de FAK y fosforila a FAK en residuos de tirosina adicionales. Las fosfotirosinas de FAK actúan como sitios de unión para una variedad de moléculas señalizadoras, incluyendo al complejo Grb2-Sos, que da lugar a la activación de Ras, PI 3-quinasa y la fosfolipasa C-γ.

los receptores de adhesión a menudo incluyen cambios en la motilidad celular, que juegan papeles críticos en procesos como la cicatrización y el desarrollo embrionario. Como se analizó en el Capítulo 12, estos aspectos del comportamiento celular están gobernados principalmente por el ensamblaje y desensamblaje dinámico de los filamentos de actina que subyacen a la membrana plasmática. La remodelación del citoesqueleto de actina representa, por tanto, un elemento clave, de la respuesta de muchas células a los estímulos extracelulares.

Miembros de la subfamilia Rho de las proteínas de unión a GTP de bajo peso molecular (incluidas **Rho**, **Rac** y **Cdc42**) juegan papeles centrales en la regulación de la organización de la motilidad celular y la adhesión celular. El papel de los miembros de la familia Rho en la remodelación citoesquelética fue demostrado por primera vez mediante experimentos que mostraban que la microinyección en fibroblastos de proteínas Rho inducía alteraciones citoesqueléticas, incluyendo la producción de protrusiones de la superficie celular (filopodios y lamelipodios), y la formación de adhesiones focales y fibras de estrés (Fig. 15.47). La microinyección de células con mutantes específicos de diferentes miembros de la familia Rho ha demostrado

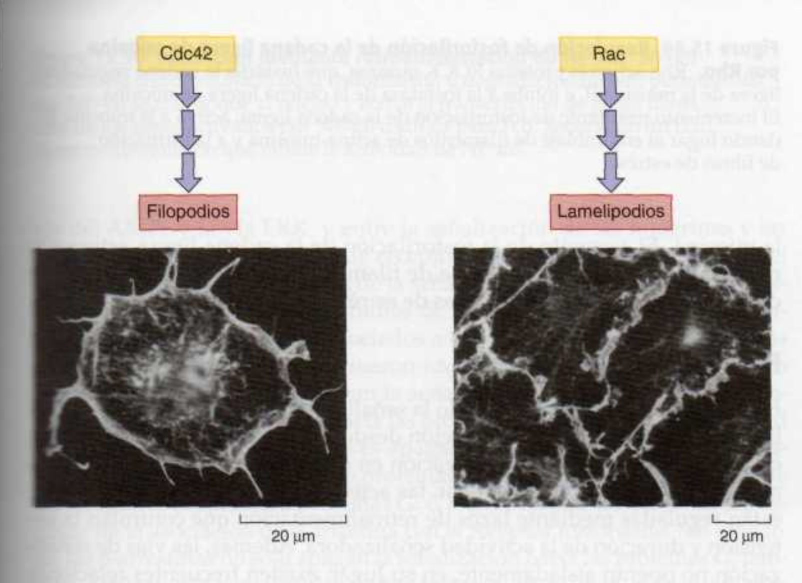




Figura 15.47 Regulación del remodelado de la actina por las proteínas de la familia Rho. Diferentes miembros de la familia Rho regulan la polimerización de la actina dando lugar a filopodios (Cdc42), lamelipodios (Rac) y adhesiones focales y fibras de estrés (Rho). Las micrografías de fluorescencia muestran la distribución de la actina tras la microinyección en fibroblastos de Cdc42, Rac y Rho. (A partir de C. D. Nobes y A. Hall, 1995. *Cell* 81:53.)

que Cdc42 induce la formación de filopodios, Rac media la formación de lamelipodios, y Rho es responsable de la formación de fibras de estrés. Estudios posteriores han demostrado que las actividades de los miembros de la familia Rho no están restringidos a los fibroblastos: También juegan papeles similares en la regulación del citoesqueleto de actina en todos los tipos de células eucariotas.

Los miembros de la familia Rho son activados mediante la señalización de las integrinas además de por los receptores de factores de crecimiento. Distintas proteínas diana pueden funcionar para mediar los cambios citoesqueléticos inducidos por Rho, Rac y Cdc42. Todas las proteínas de la familia Rho estimulan la polimerización de la actina (Fig. 15.48). Tanto Rac como Cdc42 estimulan a proteínas pertenecientes a la familia WASP, que activan al complejo Arp2/3 y ponen en marcha el proceso de ramificación de los filamentos de actina para formar filopodios y lamelipodios. Por el contrario, Rho actúa activando a las forminas, que estimulan la nucleación y la prolongación de filamentos no ramificados de actina para crear fibras de estrés. Otra diana de Rho en la inducción de la formación de estas fibras es una proteína quinasa de serina/treonina conocida como ROCK (Fig. 15.49) y cuya activación incrementa la fosforilación de la cadena ligera de la miosina II a través de dos mecanismos: ROCK no se limita a fosforilar esta cadena ligera, sino que también fosforila e inhibe a la fosfatasa de la cadena ligera de

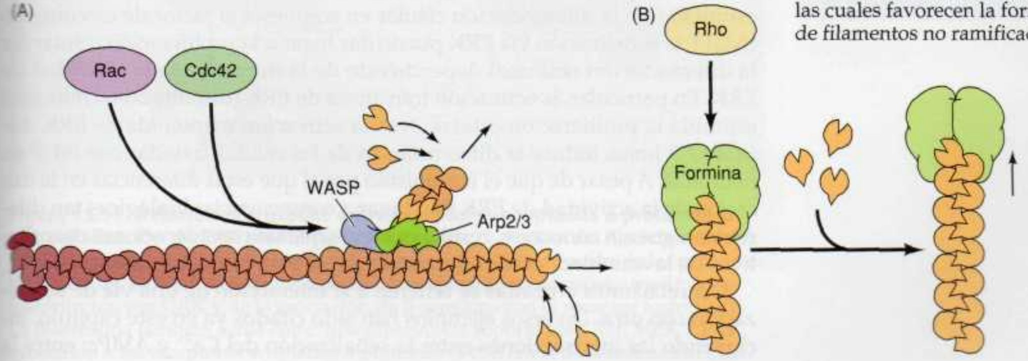


Figura 15.48 Estimulación de la polimerización por parte de las proteínas de la familia Rho. (A) Rac y Cdc42 estimulan a proteínas de la familia WASP que activan a Arp2/3 y ponen en marcha la formación de filamentos ramificados de actina. (B) Rho activa a las forminas, las cuales favorecen la formación de filamentos no ramificados de actina.

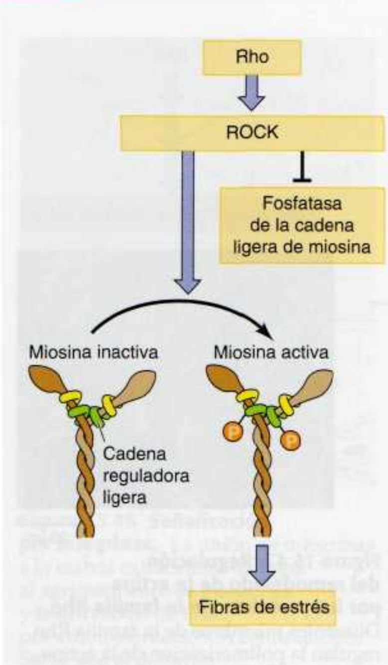


Figura 15.49 Regulación de fosforilación de la cadena ligera de miosina por Rho. Rho activa la proteína ROCK quinasa, que fosforila la cadena reguladora ligera de la miosina II, e inhibe a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina. El incremento resultante de fosforilación de la cadena ligera, activa a la miosina II, dando lugar al ensamblaje de filamentos de actina-miosina y a la formación de fibras de estrés.

la miosina. El aumento de la fosforilación de la cadena ligera activa a la miosina y favorece el ensamblaje de filamentos de actina-miosina, lo que dará lugar a la formación de fibras de estrés y adhesiones focales.

Redes de señalización

Hasta el momento se ha analizado la señalización en términos de vías rectilíneas que transmiten la información desde el ambiente hacia dianas intracelulares. Sin embargo, la señalización en el interior de la célula es mucho más complicada. En primer lugar, las actividades de las vías individuales están reguladas mediante lazos de retroalimentación que controlan la extensión y duración de la actividad señalizadora. Además, las vías de señalización no operan aisladamente; en su lugar, existen frecuentes relaciones cruzadas entre diferentes vías, de modo que la transducción de la señal intracelular en último término debe entenderse como una red integrada de vías conectadas. La modelización informática de estas redes de señalización es, actualmente, un gran reto de la biología celular, que será necesario para comprender la respuesta dinámica de las células a su ambiente.

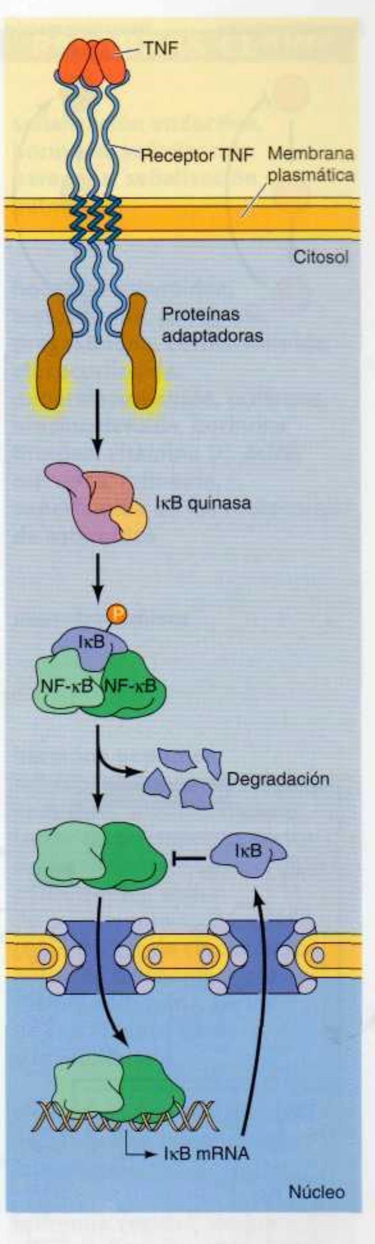
Retroalimentación y relaciones cruzadas

La actividad de las vías de señalización está controlada mediante **lazos de retroalimentación**, que son similares a la regulación retroalimentaria principal de las vías metabólicas (véase Fig. 8.37). Un buen ejemplo de una retroalimentación negativa la proporciona la vía NF-κB (Fig. 15.50). NF-κB es activado por señales que desencadenan la proteólisis del inhibidor IκB, permitiendo que NF-κB se transloque al núcleo e induzca la expresión de sus genes diana. Uno de los genes diana inducidos por NF-κB codifica IκB, de forma que la señalización vía NF-κB da lugar a la síntesis de nuevas moléculas de IκB, lo que inhibe una actividad continuada de NF-κB. Esta regulación es crítica porque la extensión y duración de la actividad NF-κB puede determinar la respuesta transcripcional de la célula. Por ejemplo, algunos genes diana son inducidos por la actividad transitoria de NF-κB, persistiendo tan solo 30-60 minutos, mientras que la inducción de otros genes requiere de varias horas de señalización mantenida por parte de NF-κB.

La señalización por parte de la MAP quinasa ERK proporciona otro ejemplo de la importancia de la duración de la señalización. En un modelo bien estudiado de la diferenciación celular en respuesta al factor de crecimiento (NGF), la señalización vía ERK puede dar lugar a la proliferación celular o a la diferenciación neuronal dependiendo de la duración de la actividad de ERK. En particular, la activación transitoria de ERK (durante 30-60 minutos) estimula la proliferación celular, pero la activación mantenida de ERK durante 2-3 horas induce la diferenciación de las células tratadas con NGF en neuronas. A pesar de que el mecanismo por el que estas diferencias en la duración de la actividad de ERK dan lugar a consecuencias biológicas tan diferentes sigue sin conocerse, resulta evidente que las consideraciones cuantitativas de la actividad señalizadora son críticas para la respuesta celular.

Las **relaciones cruzadas** se refieren a la interacción de una vía de señalización con otra. Diversos ejemplos han sido citados ya en este capítulo, incluyendo las intersecciones entre la señalización del Ca^{2+} y AMPc, entre la

Figura 15.50 Inhibición mediante retroalimentación de NF-κB. NF-κB es activado como resultado de la fosforilación y degradación de IκB, permitiendo que NF-κB se transloque al núcleo y active la transcripción de genes diana. Uno de los genes activados por NF-κB codifica para IκB, generando un lazo de retroalimentación que inhibe la actividad de NF-κB.



vía del AMPc y la vía ERK, y entre la señalización de las integrinas y las proteína quinasas de tirosinas de receptores. Un ejemplo interesante en el que la regulación de la duración de la señalización está combinada con relaciones cruzadas, proviene de estudios de los receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores están asociados a la señalización vía MAP quinasas mediante las **β-arrestinas**, que fueron identificadas en primer lugar como proteínas reguladoras que apagan la señalización procedente de los receptores acoplados a proteínas G hacia las proteínas G (Fig. 15.51). La actividad señalizadora de estos receptores es apagada como resultado de la fosforilación por parte de una familia de proteínas denominadas GRK (quinasas de los receptores acoplados a proteínas G: *G protein-coupled receptor kinases*), seguido de la asociación de β-arrestina con el receptor fosforilado. Sin embargo, las β-arrestinas no sólo apagan la señalización hacia las proteínas G: también actúan como moléculas señalizadoras en sí que estimulan vías adicionales, incluyendo proteína- tirosina quinasas no asociadas a receptores (por ejemplo, miembros de la familia Src) y vías de las MAP quinasas. En particular, la β-arrestina-2 actúa como una proteína de soporte para la señalización Raf-MEK-ERK, asociando directamente esta vía de MAP quinasa con los receptores acoplados a proteínas G.

Redes de transducción de la señal celular

Las extensas relaciones cruzadas entre vías de transducción de la señal individuales significa que múltiples vías interaccionan entre sí para formar

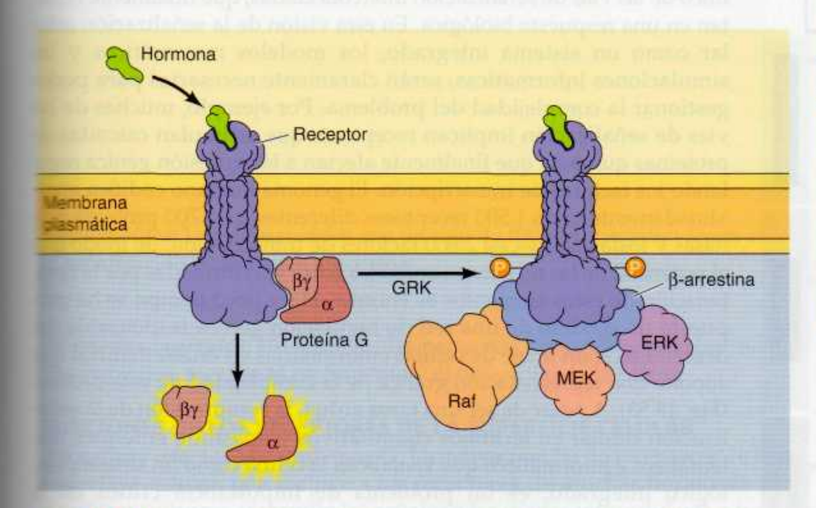
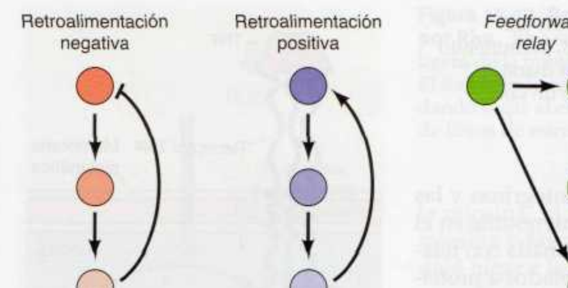


Figura 15.51 Relaciones cruzadas entre receptores acoplados a proteínas G y la señalización de ERK mediante la β-arrestina. La unión del ligando estimula a los receptores acoplados a proteínas G, dando lugar a la activación de las proteínas G triméricas. La actividad de los receptores es apagada como consecuencia de su fosforilación por GRK y de la asociación de β-arrestina con el receptor fosforilado. La β-arrestina también actúa como una proteína de soporte para Raf, MEK y ERK, asociando a los receptores acoplados a proteínas G con la vía de señalización ERK.



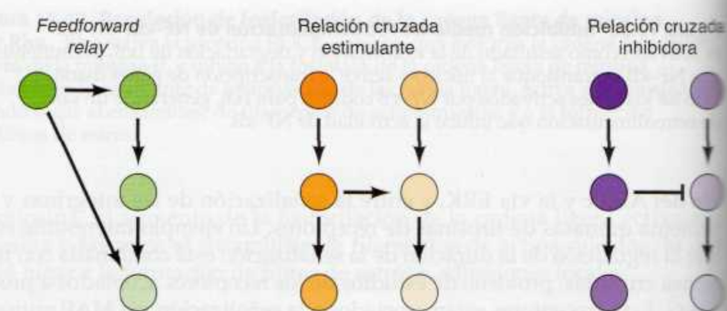


Figura 15.52 Elementos de las redes de señalización. En los lazos de retroalimentación, un elemento corriente abajo de una vía inhibe (retroalimentación negativa) o estimula (retroalimentación positiva) un elemento que se encuentra corriente arriba. En las *feedforward relays*, un elemento corriente arriba de una vía estimula tanto a su diana inmediata como a otro elemento que se encuentra todavía más corriente abajo. Las relaciones cruzadas ocurren cuando un elemento de una vía estimula o inhibe un elemento de una segunda vía.

redes de señalización en el interior celular. Algunas de las formas en que las vías pueden conectarse en una red están ilustradas en la Figura 15.52. Las intersecciones entre las diferentes vías pueden ser positivas (en las que una vía estimula a la otra) o negativas (donde una vía inhibe a la otra). Además de los lazos de retroalimentación negativa, las redes de señalización pueden contener lazos de retroalimentación positivos y ***feedforward relays* o transmisión de alimentación delantera** en los que la actividad de un componente de una vía estimula un componente distante corriente abajo.

Una comprensión completa de la señalización celular requerirá el desarrollo de modelos de redes que predigan el comportamiento dinámico de las vías de señalización interconectadas, que finalmente resultan en una respuesta biológica. En esta visión de la señalización celular como un sistema integrado, los modelos matemáticos y las simulaciones informáticas, serán claramente necesarias para poder gestionar la complejidad del problema. Por ejemplo, muchas de las vías de señalización implican receptores que estimulan cascadas de proteínas quinasas que finalmente afectan a la expresión génica regulando los factores de transcripción. El genoma humano codifica aproximadamente unos 1.500 receptores diferentes, casi 700 proteína quinasas y fosfatasas, y casi 2.000 factores de transcripción, de modo que el potencial de las relaciones cruzadas entre vías formadas por la combinación de estos elementos es enorme. Hace poco tiempo se ha propuesto un modelo de una red de regulación génica responsable del desarrollo de un linaje de células embrionarias en erizos marinos que supone una representación gráfica de la complejidad de este proceso (Fig. 15.53). A pesar de ser una tarea ardua, la comprensión de la señalización celular en términos cuantitativos empleando enfoques matemáticos e informáticos que visualicen la célula como un sistema biológico integrado, es un problema de importancia crítica en la investigación puntera de la biología celular.

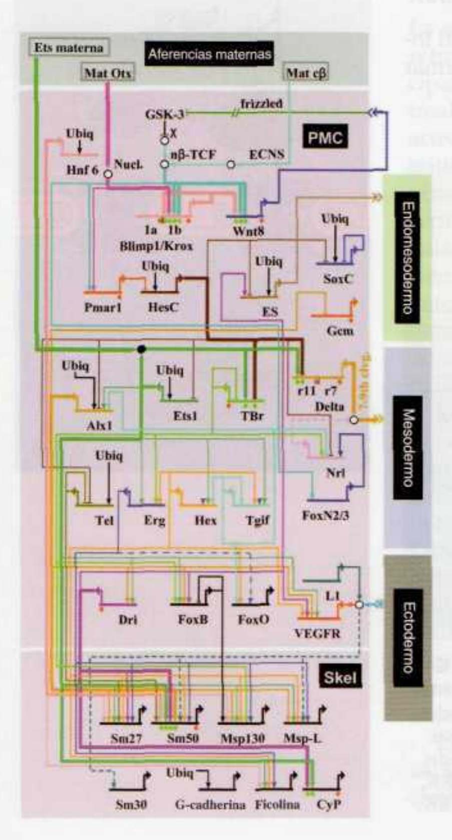


Figura 15.53 Una red de regulación génica. La red engloba todos los genes reguladores necesarios para el desarrollo de las células embrionarias que darán lugar a células esqueléticas del erizo marino. (Tomado de P. Oliveri y cols., 2008. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 105:5955.)

RESUMEN

MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS Y SUS RECEPTORES

Tipos de señalización célula-célula: La mayoría de las moléculas señalizadoras son secretadas por una célula y se unen a los receptores que se expresan en una célula diana. En general, los tipos de señalización célula-célula son tres (señalización endocrina, paracrina y autocrina) en función de la distancia que tienen que recorrer las señales.

Hormonas esteroideas y la superfamilia de los receptores de esteroides: Las hormonas esteroideas, la hormona tiroidea, la vitamina D_3 y el ácido retinoico son moléculas hidrofóbicas pequeñas que difunden a través de la membrana plasmática de sus células diana y se unen a receptores intracelulares. Los miembros de la superfamilia de los receptores de esteroides funcionan como factores de transcripción, regulando directamente la expresión génica en respuesta a la unión del ligando.

Óxido nítrico y monóxido de carbono: Los gases sencillos óxido nítrico y monóxido de carbono son moléculas importantes de la señalización paracrina en el sistema nervioso y en otros tipos celulares.

Neurotransmisores: Los neurotransmisores son pequeñas moléculas hidrofílicas que transportan las señales en las sinapsis entre las neuronas o entre la neurona y otras células diana. Muchos neurotransmisores se unen a canales iónicos regulados por ligando.

Hormonas peptídicas y factores de crecimiento: El tipo de moléculas señalizadoras más amplio y variado en los animales tienen carácter peptídico y oscilan entre unos pocos hasta más de cien aminoácidos. Este grupo de moléculas incluye a las hormonas peptídicas, a los neuropéptidos y a los factores de crecimiento.

Eicosanoides: Los eicosanoides son un tipo de lípidos que intervienen en la señalización paracrina y autocrina.

Hormonas vegetales: Unas moléculas pequeñas, conocidas como hormonas vegetales, regulan el crecimiento y el desarrollo de la planta.

FUNCIONES DE LOS RECEPTORES DE LA SUPERFICIE CELULAR

Receptores asociados a proteínas G: La mayor familia de receptores de la superficie celular, que incluye a los receptores de muchas hormonas y neurotransmisores, transmite las señales a las dianas intracelulares a través de la acción de proteínas G.

Receptores proteína-tirosina quinasas: Los receptores para la mayoría de los factores de crecimiento son proteína-tirosina quinasas.

PALABRAS CLAVE

señalización endocrina, hormona, señalización paracrina, señalización autocrina

hormona esteroidea, testosterona, estrógeno, progesterona, corticosteroide, glucocorticoide, mineralocorticoide, ecdisona, brasinosteroide, hormona tiroidea, vitamina D_3, ácido retinoico, retinoide, superfamilia de los receptores de esteroides

neurotransmisor

hormona peptídica, neuropéptido, encefalina, endorfina, neurohormona, factor de crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), citoquina, factor de crecimiento unido a la membrana

eicosanoide, prostaglandina, prostaciclina, tromboxano, leucotrieno

hormona vegetal, auxina, giberelina, citoquinina, ácido abscísico, etileno

proteína G, receptor asociado a proteína G, proteína G heterotrimérica

receptor proteína-tirosina *quinasa, autofosforilación,* dominio SH2, dominio PTB

PALABRAS CLAVE

superfamilia de los receptores de citoquinas, proteína-tirosina quinasa no receptora, quinasa Janus (JAK)

proteína-tirosina fosfatasa, factor de crecimiento transformante β (TGF-β), proteína-serina/treonina quinasa, guanilato ciclasa

transducción intracelular de señales, AMP cíclico (AMPc), segundo mensajero, adenilato ciclasa, fosfodiesterasa de AMPc, proteína quinasa dependiente de AMPc (proteína quinasa A), elemento de respuesta a AMPc (CRE), CREB

GMP cíclico (GMPc) rodopsina, transducina, fosfodiesterasa de GMPc

fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2), fosfolipasa C, diacilglicerol, inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3), proteína quinasa C, calmodulina, CaM quinasa, receptor de rianodina

fosfatidilinosítido (PI) 3 quinasa, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3), Akt, mTOR

quinasa MAP, ERK, Ras, Raf, MEK, factor de intercambio de nucleótidos de guanina, proteína activadora de la GTPasa, gen temprano inmediato, elemento de respuesta al suero (SRE),

RESUMEN

Receptores de citoquinas y proteína-tirosina quinasas no receptoras: Los receptores para muchas citoquinas actúan en asociación con proteína-tirosina quinasas no receptoras.

Receptores asociados a otras actividades enzimáticas: Otro tipo de receptores de la superficie celular incluyen a las proteína-tirosina fosfatasas, a las proteína-serina/treonina quinasas y a las guanilato ciclasas.

VÍAS DE TRANSDUCCIÓN INTRACELULAR DE SEÑALES

Vía del AMPc: segundos mensajeros y la fosforilación de proteínas: El AMP cíclico es un segundo mensajero importante en la respuesta de las células animales a diversidad de hormonas y a moléculas olorosas. La mayoría de las acciones del AMPc están mediadas por la proteína quinasa A, que fosforila tanto a enzimas metabólicas como al factor de transcripción CREB.

GMP cíclico: El GMP cíclico también es un segundo mensajero importante en las células animales. Su papel mejor caracterizado es en la recepción visual en el ojo de vertebrados.

Fosfolípidos y Ca^{2+}: Los fosfolípidos y el Ca^{2+} son segundos mensajeros comunes, que se activan con posterioridad (*downstream*) a los receptores asociados a proteínas G y a las proteína quinasas. La hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) da lugar al diacilglicerol y al inositol 1,4,5, trifosfato (IP_3) que, respectivamente, activan a la proteína quinasa C y movilizan el Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. Los niveles elevados de Ca^{2+} intracelular activan varias proteínas diana, incluyendo a las proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}/calmodulina. En las células excitables eléctricamente del músculo y del sistema nervioso, el nivel del Ca^{2+} citosólico aumenta al abrirse los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje en la membrana plasmática y los receptores de rianodina en el retículo sarcoplásmico y endoplásmico.

Vías PI-3 quinasa/Akt y mTOR: Además de ser escindido en diacilglicerol e IP_3, el PIP_2 puede fosforilarse para formar el característico segundo mensajero PIP_3. Esto desencadena la activación de la proteína-serina/treonina quinasa Akt, que desempeña un papel clave en la supervivencia celular. Una de las dianas de la señalización de Akt es la proteína quinasa mTOR, que es un regulador central del crecimiento celular y acopla la síntesis proteica a la disponibilidad de factores de crecimiento, nutrientes y energía celular.

Vía de las quinasas MAP: La vía de las quinasas MAP es una cadena de proteína quinasas conservada, que se activa a partir de varias señales extracelulares. En las células animales, las formas mejor caracterizadas de MAP quinasas se acoplan a los receptores del factor de crecimiento por una pequeña proteína de unión a GTP denominada Ras, que inicia la cascada de proteína quinasas que conduce a la activación de la quinasa MAP (ERK). Entonces, ERK fosforila a varias proteínas citosólicas y nu-

RESUMEN

cleares, incluyendo a factores de transcripción que inducen la expresión de genes tempranos inmediatos. Otras vías de las MAP quinasas median respuestas de las células de mamíferos a la inflamación y el estrés. Los componentes de las vías de las MAP quinasas están organizados por las proteínas *scaffold*, que juegan un papel importante en mantener la especificidad de la señalización de las MAP quinasas.

Vías JAK/STAT y TGF-β/Smad: Las proteínas STAT son factores de transcripción que contienen dominios SH2, y que son activadas directamente por proteína-tirosina quinasas asociadas a receptores de citoquinas. Los miembros de la familia de receptores de TGF-β son proteína-serina/treonina quinasas que fosforilan y activan directamente factores de transcripción Smad.

Señalización vía NF-κB: Los miembros de la familia de factores de transcripción NF-κB se activan en respuesta a citoquinas, factores de crecimiento y una diversidad de otros estímulos. Su activación está mediada por la fosforilación y degradación de subunidades inhibitorias IκB.

Vías Hedgehog, Wnt y Notch: Las vías Hedgehog, Wnt y Notch juegan papeles clave en la determinación del destino celular y la formación de patrones durante el desarrollo animal. Las vías de señalización Hedgehog y Wnt actúan previniendo la degradación de factores de transcripción que forman complejos en el citoplasma. La señalización vía Notch está mediada por interacciones directas célula-célula, que inducen la escisión proteolítica de Notch, seguida de la translocación del dominio intracelular de Notch al núcleo donde interacciona con un factor de transcripción para afectar a la expresión de genes diana.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y CITOESQUELETO

Integrinas y transducción de señales: La unión de las integrinas a la matriz extracelular estimula las proteína-tirosina quinasas no receptoras FAK y Src, dando lugar a la activación de la fosfolipasa C, la PI 3-quinasa y las vías de señalización Ras/Raf/ERK.

Regulación del citoesqueleto de actina: Los factores de crecimiento inducen alteraciones en el movimiento y en la forma celular mediante la remodelación del citoesqueleto de actina. Estas alteraciones del citoesqueleto se producen a través de miembros de la subfamilia Rho de proteínas pequeñas de unión a GTP.

REDES DE SEÑALIZACIÓN

Retroalimentación y relaciones cruzadas: La actividad de las vías de señalización en el interior de la célula está regulada por lazos de retroalimentación que controlan la extensión y duración de la señalización. Diferentes vías de señalización también interaccionan para regular su actividad entre sí.

Redes de transducción de la señal celular: Las extensas redes cruzadas que existen entre vías individuales dan lugar a la formación de complejas redes de señalización. Una comprensión completa de la señalización en el interior celular requerirá el desarrollo de modelos de redes cuantitativas.

PALABRAS CLAVE

factor de respuesta al suero (SRF), Elk-1, gen de respuesta secundaria, proteínas *scaffold*

vía JAK/STAT, proteína STAT, Smad

NF-κB, factor de necrosis tumoral, receptor tipo Toll, IκB

Hedgehog, Wnt, Notch

FAK

Rho, Rac, Cdc42

lazo de retroalimentación, relaciones cruzadas, β-arrestina

red de señalización, *feedforward relay*

Preguntas

1. ¿Cuál es la diferencia entre la señalización paracrina y la endocrina?

2. ¿En qué difieren la señalización por moléculas señal hidrofóbicas, como las hormonas esteroídicas, de la señalización por moléculas señal hidrofílicas, como las hormonas proteicas?

3. ¿Cómo actúa la aspirina para reducir la inflamación y la coagulación sanguínea?

4. Las hormonas que activan a un receptor acoplado a la proteína G_s estimula la proliferación de las células tiroideas. ¿Cómo afectarían inhibidores de la AMPc fosfodiesterasa a la proliferación de estas células?

5. El receptor de la epinefrina está asociado a G_s, mientras que el receptor de la acetilcolina (en las células del músculo cardíaco) está asociado a G_i. Supón que tienes que construir una molécula recombinante que contenga las secuencias extracelulares del receptor de la epinefrina junto a las secuencias citosólicas del receptor de la acetilcolina. ¿Qué efecto causaría la epinefrina sobre los niveles de AMPc en las células que expresen este receptor recombinante? ¿Cuál sería el efecto de la acetilcolina?

6. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es un dímero constituido por dos cadenas polipeptídicas. ¿Cuál sería el efecto previsto de los monómeros de PDGF en la señalización desde el receptor de PDGF?

7. Has generado una versión truncada del receptor de EGF que carece del dominio tirosina quinasa. La expresión de este receptor truncado inhibe la respuesta de las células a EGF. ¿Por qué?

8. ¿Cómo afectaría la sobreexpresión de la proteína fosfatasa 1 a la inducción de genes inducibles por AMPc, en respuesta a la estimulación hormonal de las células diana apropiadas? ¿Afectaría la proteína fosfatasa 1 a la función de los canales iónicos regulados por AMPc responsables de la recepción de moléculas olorosas?

9. ¿Cómo regula la vía PI 3-quinasa/Akt la síntesis proteica en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento?

10. Estás estudiando un gen inmediato temprano que es inducido por la vía Ras/Raf/MEK/ERK en respuesta al tratamiento de fibroblastos con factor de crecimiento. ¿Cómo afectaría la expresión de ARNsi frente a Sos a la inducción de este gen?

11. Un miembro específico de la familia STAT induce determinados genes hepáticos en respuesta a la estimulación por una citoquina. ¿Cómo se vería afectada la inducción de estos genes si sobreexpresaras un mutante dominante negativo de JAK?

12. Estás estudiando un gen que es inducido por la vía de señalización Wnt. Para determinar el papel desempeñado por la β-catenina, haces diferentes mutantes de la β-catenina específicos de sitio. Descubres que cambiar un residuo específico de Lys a Arg da lugar a la acumulación nuclear de β-catenina y a la expresión constitutiva del gen (incluso en ausencia de estimulación por Wnt). ¿Cuál es el mecanismo más probable por el que esta mutación altera la actividad de la β-catenina?

Bibliografía

Moléculas señalizadoras y sus receptores

Andrea, J., R. Gallini and C. Betsholtz. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22: 1276–1312. [R]

Arai, K., F. Lee, A. Miyajima, S. Miyatake, N. Arai and T. Yokota. 1990. Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 783–836. [R]

Burgess, W. H. and T. Maciag. 1989. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 575–606. [R]

Calabrese, V., C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D. A. Butterfield and A. M. G. Stella. 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Rev. Neurosci.* 8: 766–775. [R]

Carpenter, G. and S. Cohen. 1990. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 265: 7709–7712. [R]

Chow, B. and P. McCourt. 2006. Plant hormone receptors: perception is everything. *Genes Dev.* 20: 1998–2008. [R]

Cohen, P. 2006. The twentieth century struggle to decipher insulin signaling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 867–873. [R]

Funk, C. D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871–1875. [R]

Hess, D. T., A. Matsumoto, S.-O. Kim, H. E. Marshall and J. S. Stamler. 2005. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 150–166. [R]

Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154–1162. [R]

Li, L. and P. K. Moore. 2007. An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules. *Biochem. Soc. Tran.* 35:1138–1141. [R]

Massagué, J. and A. Pandiella. 1993. Membrane-anchored growth factors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 515–541. [R]

McDonnell, D. P. and J. D. Norris. 2002. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296: 1642–1644. [R]

Minna, J. D., A. F. Gazdar, S. R. Sprang and J. Herz. 2004. A bull's eye for targeted lung cancer therapy. *Science* 304: 1458–1461. [R]

Nagy, L. and J. W. R. Schwabe. 2004. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* 29: 317–324. [R]

Picard, D. 2006. Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrinol. Metab.* 17: 229–235. [R]

Psaty, B. M. and J. D. Potter. 2006. Risks and benefits of celecoxib to prevent recurrent adenomas. *N. Engl. J. Med.* 355: 950–952. [R]

Smalley, W. and R. N. DuBois. 1997. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv. Pharmacol.* 39: 1–20. [R]

Sonoda, J., L. Pei and R. M. Evans. 2008. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Let.* 582: 2–9. [R]

Teale, W. D., I. A. Paponov and K. Palme. 2006. Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 847–859. [R]

Funciones de los receptores de la superficie celular

Baker, S. J., S. G. Rane and E. P. Reddy. 2007. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 26: 6724–6737. [R]

Blume-Jensen, P. and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411: 355–365. [R]

Garbers, D. L., T. D. Chrisman, P. Wiegn, T. Katafuchi, J. P. Albanesi, V. Bielinski, B. Barylko, M. M. Redfield and J. C. Burnett Jr. 2006. Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol. Metab.* 17: 251–258. [R]

Hunter, T. and B. M. Sefton. 1980. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 1311–1315. [P]

Kitisin, K., T. Saha, T. Blake, N. Golestaneh, M. Deng, C. Kim, Y. Tang, K. Shetty, B. Mishra and L. Mishra. 2007. TGF-β signaling in development. *Science STKE* 2007, cm1. [R]

Lefkowitz, R. J. 2004. Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 25: 413–422. [R]

Malbon, C. C. 2005. G proteins in development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 689–701. [R]

Neves, S. R., P. T. Ram and R. Iyengar. 2002. G protein pathways. *Science* 296: 1636–1639. [R]

Oldham, W. M. and H. E. Hamm. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 60–71. [R]

Parsons, S. J. and J. T. Parsons. 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23: 7906–7909. [R]

Schnidler, C., D. E. Levy and T. Decker. 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J. Biol. Chem.* 282: 20059–20063. [R]

Schlessinger, J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211–225. [R]

Schlessinger, J. 2004. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* 306: 1506–1507. [R]

Singer, A. L. and G. A. Koretsky. 2002. Control of T cell function by positive and negative regulators. *Science* 296: 1639–1640. [R]

Tonks, N. K. 2006. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 833–846. [R]

Vías de transducción intracelular de señales

Arshavsky, V. Y., T. D. Lamb and E. N. Pugh Jr. 2002. G proteins and phototransduction. *Ann. Rev. Physiol.* 64: 153–187. [R]

Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick. 2003. Calcium signaling: Dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 517–529. [R]

Brazil, D. P., Z.-Z. Yang, and B. A. Hemmings. 2004. Advances in protein kinase B signaling: *AKT*ion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* 29: 233–242. [R]

Brivanlou, A. H. and J. E. Darnell Jr. 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295: 813–818. [R]

Calnan, D. R. and A. Brunet. 2008. The FoxO code. *Oncogene* 27: 2276–2288. [R]

Clapham, D. E. 2007. Calcium signaling. *Cell* 131: 1047–1058. [R]

Clevers, H. 2006. Wnt/β-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469–480. [R]

Conti, M. and J. Beavo. 2007. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 481–511. [R]

Corcoran, E. E. and A. R. Means. 2001. Defining Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 276: 2975–2978. [R]

Craven, K. B. and W. N. Zagotta. 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Ann. Rev. Physiol.* 68: 375–401. [R]

Engelman, J. A., J. Luo and L. C. Cantley. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Rev. Genet.* 7: 606–619. [R]

Gay, N. J. and M. Gangloff. 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 141–165. [R]

Hayden, M. S. and S. Ghosh. 2008. Shared principles in NF-κB signaling. *Cell* 132: 344–362. [R]

Hofmann, F. 2005. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 280: 1–4. [R]

Huang, H. and X. He. 2008. Wnt/β-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 119–125. [R]

Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225–236. [R]

Irvine, R. F. 2003. 20 years of Ins(1,4,5)P_3 and 40 years before. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 586–590. [R]

Johnson, G. L. and R. Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911–1912. [R]

Jope, R. S. and G. V. W. Johnson. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29: 95–102. [R]

Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912–1934. [R]

Massagué, J., J. Seoane and D. Wotton. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19: 2783–2810. [R]

Mayr, B. and M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 599–609. [R]

McKay, M. M. and D. K. Morrison. 2007. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26: 3113–3121. [R]

Neves, S. R., P. T. Ram and R. Iyengar. 2002. G protein pathways. *Science* 296: 1636–1639. [R]

Newton, A. C. 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* 370: 361–371. [R]

Raman, M., W. Chen and M. H. Cobb. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26: 3100–3112. [R]

Rohatgi, R. and M. P. Scott. 2007. Patching the gaps in Hedgehog signaling. *Nature Cell Biol.* 9: 1005–1009. [R]

Sabatini, D. M. 2006. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature Rev. Cancer* 6:729–734. [R]

Schindler, C., D. E. Levy and T. Decker. 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J. Biol. Chem.* 282: 20059–20063. [R]

Schmierer, B. and C. S. Hill. 2007. TGFβ-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 970–982. [R]

Taylor, S. S., C. Kim, C. Y. Cheng, S. H. J. Brown, J. Wu and N. Kannan. 2008. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim. Biophys. Acta* 1784: 16–26. [R]

Turjanski, A. G., J. P. Vaque and J. S. Gutkind. 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26: 3240–3253. [R]

Venkatachalam, K., D. B. van Rossum, R. L. Patterson, H.-T. Ma and D. L. Gill. 2002. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell. Biol.* 4: E263–272. [R]

Wang, Y., A. P. McMahon and B. L. Allen. 2007. Shifting paradigms in Hedgehog signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19: 159–165. [R]

Watt, F. M., S. Estrach and C. A. Ambler. 2008. Epidermal Notch signaling: differentiation, cancer and adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 171–179. [R]

Wellbrock, C., M. Karasarides and R. Marais. 2004. The Raf proteins take centre stage. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 875–885. [R]

Zalk, R., S. E. Lahnart and A. R. Marks. 2007. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 367–385. [R]

Transducción de señales y citoesqueleto

Burridge, K. and K. Wennerberg. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell* 116: 167–179. [R]

DeMali, K. A., K. Wennerberg and K. Burridge. 2003. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 572–582. [R]

Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* 285: 1028–1032. [R]

Hynes, R. O. 2002. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673–687. [R]

Jaffe, A. B. and A. Hall. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 247–269. [R]

Miranti, C. K. and J. S. Brugge. 2002. Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. *Nature Cell Biol.* 4: E83–E90. [R]

Mitra, S. K. and D. D. Schlaepfer. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in nor-

mal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 516–523. [R]

Nobles, C. D. and A. Hall. 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81: 53–62. [P]

Ridley, A. J. 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* 16: 522–529. [R]

Schwartz, M. A. and M. H. Ginsberg. 2002. Networks and crosstalk: Integrin signalling spreads. *Nature Cell Biol.* 4: E65–E68. [R]

Redes de señalización

Aldridge, B. B., J. M. Burke, D. A. Lauffenburger and P. K. Sorger. 2006. Physicochemical modelling of cell signalling pathways. *Nature Cell Biol.* 8: 1195–1203. [R[

Eungdamrong, N. J. and R. Iyengar. 2004. Computational approaches for modeling regulatory cellular networks. *Trends Cell Biol.* 14: 661–669. [R]

Hoffmann, A., A. Levchenko, M. L. Scott and D. Baltimore. 2002. The IκB—NF-κB signaling module: Temporal control and selective gene activation. *Science* 298: 1241–1245. [P]

Lefkowitz, R. J. and S. K. Shenoy. 2005. Transduction of receptor signals by β-arrestins. *Science* 308: 512–517. [R]

Ma'ayan, A., S. L. Jenkins, S. Neves, A. Hasseldine, E. Grace, B. Dubin-Thaler, N. J. Eungdamrong, G. Weng, P. T. Ram, J. J. Rice, A. Kershenbaum, G. A. Stolovitzky, R. D. Blitzer, and R. Iyengar. 2005. Formation of regulatory patterns during signal propagation in a mammalian cellular network. *Science* 309: 1078–1083. [P]

Marshall, C. J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179–185. [R]

Olivieri, P., Q. Tu and E. H. Davidson. 2008. Global regulatory logic for specification of an embryonic cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 5955–5962. [P]

Papin, J. A., T. Hunter, B. O. Palsson and S. Subramaniam. 2005. Reconstruction of cellular signaling networks and analysis of their properties. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 99–111. [R]

Zhu, X., M. Gerstein and M. Snyder. 2007. Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes Dev.* 21: 1010–1024. [R]

CAPÍTULO 16

Ciclo celular

La capacidad de autorreproducirse probablemente sea la característica fundamental de las células —al igual que podría decirse de los seres vivos—. Todas las células se reproducen mediante su división en dos, cada célula parental dando lugar a dos células hijas al final de cada ciclo de división celular. Estas células hijas a su vez pueden crecer y dividirse, dando lugar a una población celular a partir del crecimiento y la división de una única célula parental y de su progenie. En el caso más sencillo, estos ciclos de crecimiento y división permiten a una única bacteria, tras la incubación, durante una noche, en una placa de agar con medio provisto de nutrientes, formar una colonia constituida por una progenie de millones de células. En un caso más complejo, ciclos repetidos de crecimiento y división celular suponen el desarrollo de una célula huevo fecundada, dando lugar a las más de 10^{14} células que componen el cuerpo humano.

La división de todas las células ha de ser finamente regulada y coordinada con el crecimiento celular y con la replicación del ADN, para asegurar la formación de una progenie de células que contengan sus genomas completos. En las células eucariotas, la progresión a lo largo del ciclo celular la controla una serie de proteína quinasas que se han conservado desde las levaduras hasta los mamíferos. En los eucariotas superiores, esta maquinaria del ciclo celular a su vez está regulada por los factores de crecimiento que controlan la proliferación celular, lo que permite coordinar la división de las células individuales con las necesidades del organismo como un todo. No debe extrañar que las alteraciones en la regulación del ciclo celular sean una causa frecuente de la proliferación anormal de las células cancerosas; por tanto, los estudios acerca del ciclo celular y del cáncer se han solapado, de igual manera que están relacionados los estudios acerca del cáncer y de las vías de señalización celular, como se vio en el Capítulo 15.

Ciclo celular eucariota

El ciclo de la división de la mayoría de las células consiste en cuatro procesos coordinados: crecimiento celular, replicación del ADN, distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas y división celular. En las bacterias, el crecimiento celular y la replicación del ADN tienen lugar durante la mayor parte del ciclo celular, y los cromosomas duplicados se distribuyen a las células hijas asociados a la membrana plasmática. Sin embargo, en los eucariotas el ciclo celular es más complejo y consiste en cuatro fases diferenciadas. Aunque el crecimiento celular suele ser un proceso continuo,

el ADN se sintetiza sólo durante una fase del ciclo celular y, entonces, los cromosomas replicados se distribuyen a los núcleos hijos mediante una compleja serie de procesos que preceden a la división celular. La progresión a través de estas etapas del ciclo celular está controlada mediante un sistema regulador conservado, que no sólo coordina los diferentes procesos del ciclo celular sino que también acopla el ciclo celular con las señales extracelulares que controlan la proliferación celular.

16.1 Animación web

Fases del ciclo celular

El ciclo celular de la mayoría de las células eucariotas está dividido en cuatro fases discretas: M, G_1, S y G_2.

Fases del ciclo celular

Un ciclo celular eucariota típico es el de las células humanas en cultivo, que se dividen aproximadamente cada 24 horas. Visto al microscopio, el ciclo celular se divide en dos etapas fundamentales: **mitosis** e **interfase**. La mitosis (división del núcleo) es la etapa más llamativa del ciclo, que corresponde a la separación de los cromosomas hijos y termina, generalmente, en la división celular (**citocinesis**). Sin embargo, la mitosis y la citocinesis duran cerca de una hora por lo que aproximadamente el 95% del ciclo celular transcurre en la interfase —el intervalo entre dos mitosis—. Durante la interfase los cromosomas se descondensan y se distribuyen por el núcleo, por lo que el núcleo presenta un aspecto uniforme. Sin embargo, a nivel molecular, en la interfase es cuando ocurren el crecimiento celular y la replicación del ADN de manera sucesiva, lo que deja a la célula preparada para la división.

La célula crece a un ritmo continuado durante la interfase, y la mayoría de las células duplican su tamaño entre una mitosis y la siguiente. En cambio, el ADN sólo se sintetiza durante una parte de la interfase. Así, la duración de la síntesis del ADN divide el ciclo de las células eucariotas en cuatro fases diferenciadas (Fig. 16.1). La **fase M** del ciclo corresponde a la mitosis, a la que suele seguir la citocinesis. A esta fase le sigue la **fase G_1** (*gap 1*), que corresponde al intervalo (*gap*) entre la mitosis y el comienzo de la replicación del ADN. Durante G_1 la célula es metabólicamente activa y está creciendo, pero no se replica su ADN. Seguidamente tiene lugar la **fase S** (síntesis), durante la que se produce la replicación del ADN. Tras finalizar la síntesis del ADN se produce la **fase G_2** (*gap 2*), durante la que prosigue el crecimiento de la célula y en la que se sintetizan proteínas en preparación para la mitosis.

Figura 16.1 Fases del ciclo celular. El ciclo de división de la mayoría de las células eucariotas se divide en cuatro fases diferenciadas: M, G_1, S y G_2. A la fase M (mitosis) le suele seguir la citocinesis. La fase S es el período durante el que tiene lugar la replicación del ADN. La célula crece durante la interfase, que incluye a las fases G_1, S y G_2. La duración de las fases del ciclo celular que se muestran aquí es característica de las células de proliferación rápida de mamífero.

La duración de estas fases del ciclo celular varía considerablemente según los distintos tipos de células. Para una célula de proliferación rápida humana típica, con una duración total del ciclo de 24 horas, la fase G_1 dura unas 11 horas, la fase S unas 8 horas, G_2 cerca de 4 horas y M una hora, aproximadamente. Sin embargo, otros tipos celulares pueden dividirse más rápidamente. Las levaduras en gemación, por ejemplo, atraviesan las cuatro fases del ciclo celular sólo en unos 90 minutos. Incluso, en células embrionarias tempranas tras la fecundación del óvulo tienen lugar ciclos celulares más cortos (30 minutos o menos) (Fig. 16.2). Pero en este caso no se produce crecimiento celular. Por el contrario, mediante estos ciclos celulares en el embrión temprano el citoplasma del huevo se divide rápidamente en células más pequeñas. En estos ciclos celulares en el embrión temprano no hay fase G_1 ni G_2, y el ADN se replica rápidamente, por lo que consisten en fases S muy cortas alternando con fases M.

A diferencia de la rápida proliferación en las células embrionarias, algunas células del animal adulto cesan por completo su división (p. ej., las células nerviosas) y muchas

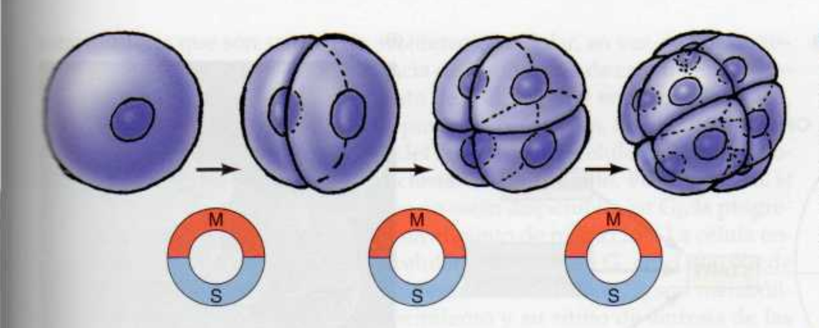


Figura 16.2 Ciclos de las células embrionarias. En los ciclos de células embrionarias tempranas, el citoplasma del ovocito se divide con rapidez para dar lugar a células más pequeñas. Las células no crecen durante estos ciclos, los cuales carecen de G_1 y de G_2, y consisten simplemente en la alternancia de cortas fases S con fases M.

16.2 Animación web

Ciclos de las células embrionarias

Durante los ciclos tempranos de las células embrionarias, las células no crecen, sino que se dividen para formar células progresivamente más peqeñas.

otras células sólo se dividen ocasionalmente, cuando es necesario reemplazar la pérdida de las células debido a una lesión o a la muerte celular. Entre este último tipo de células se incluyen a los fibroblastos de la piel, así como a las células de muchos órganos internos, como el hígado, el riñón y el pulmón. Como se tratará más adelante en la sección siguiente, estas células salen de G_1 para entrar en un estado de reposo del ciclo denominado **G_0**, en el que permanecen activas metabólicamente pero no proliferan a no ser que sean requeridas para ello mediante las señales extracelulares apropiadas.

El análisis del ciclo celular requiere que las células se identifiquen en las diferentes etapas indicadas anteriormente. Aunque las células mitóticas se pueden distinguir al microscopio, las células en las otras fases del ciclo (G_1, S y G_2) han de ser identificadas mediante criterios bioquímicos. En la mayoría de los casos, las células en estadios diferentes del ciclo celular se diferencian por su cantidad de ADN (Fig. 16.3). Por ejemplo, las células animales en G_1 son diploides (contienen dos copias de cada cromosoma), por lo que se dice que su cantidad de ADN es $2n$ (se designa por n al contenido de ADN haploide en el genoma). Durante la fase S, mediante la replicación se aumenta la cantidad de ADN de la célula de $2n$ a $4n$, por lo que las células en fase S tendrán una cantidad de ADN entre $2n$ y $4n$. El contenido de ADN se mantiene en $4n$ en las células en G_2 y en M, y se reduce a $2n$ tras la citocinesis. La cantidad de ADN celular se puede determinar experimentalmente incubando las células con una tinción fluorescente que se una al ADN, y posteriormente analizando la intensidad de la fluorescencia en las células individuales por **citometría de flujo** o mediante un **separador celular de fluorescencia**; de esta manera se distinguen las células en las fases G_1, S y G_2/M del ciclo celular.

Regulación del ciclo celular por el crecimiento celular y por señales extracelulares

La progresión de las células a través del ciclo de división celular se regula por señales extracelulares del medio, así como por señales internas que supervisan y coordinan los diversos procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular. Un ejemplo de la regulación del ciclo celular por señales extracelulares lo proporciona el efecto de los factores de crecimiento sobre la proliferación de las células animales. Además, diversos pro-

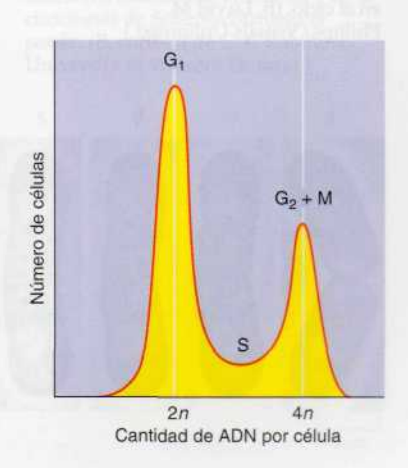


Figura 16.3 Determinación de la cantidad de ADN celular. Una población de células se marca con una tinción fluorescente que se une al ADN. Entonces se hace pasar a las células por un citofluorímetro de flujo, que mide la intensidad de la fluorescencia en las células individuales. Los datos se representan como el número de células frente a la intensidad de la fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN. La distribución muestra dos picos, que corresponden a las células con un contenido de ADN de $2n$ y de $4n$; estas células están en las fases G_1 y G_2/M del ciclo, respectivamente. Las células en la fase S tienen una cantidad de ADN entre $2n$ y $4n$, y se distribuyen entre los dos picos.

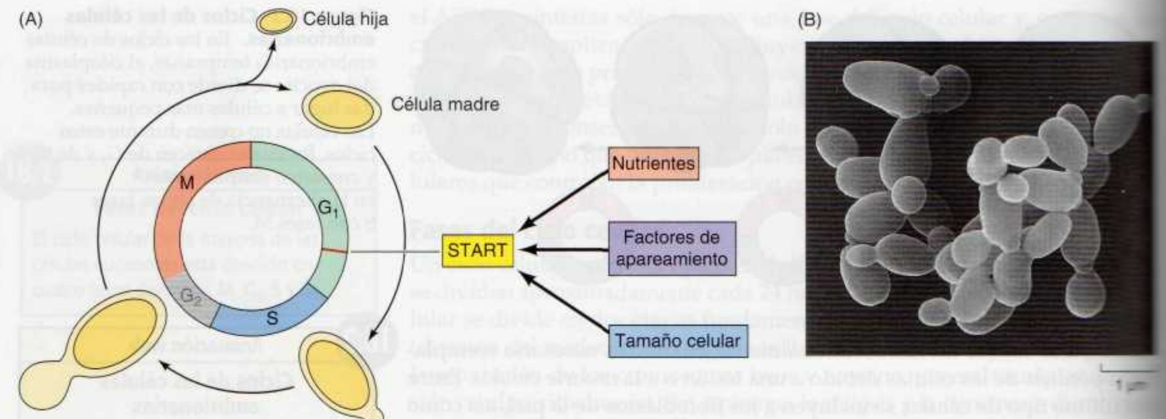


Figura 16.4 Regulación del ciclo celular de la levadura de gemación. (A) El ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* se regula principalmente en un punto de la fase G_1 avanzada, denominado START. El paso por START está controlado por la disponibilidad de nutrientes, de factores de apareamiento y por el tamaño celular. Cabe destacar que estas levaduras se dividen por gemación. Las yemas se generan justo después de START y continúan creciendo hasta que se separan de la célula madre tras la mitosis. La célula hija que se forma a partir de la yema es más pequeña que la célula madre y, por tanto, requiere más tiempo para crecer durante la fase G_1 del siguiente ciclo celular. Aunque las fases G_1 y S tienen lugar de manera normal, el huso mitótico comienza a formarse durante la fase S, por lo que el ciclo celular de la levadura de gemación carece de una fase G_2 diferenciada. (B) Micrografía al microscopio electrónico de barrido de *S. cerevisiae*. El tamaño de la yema refleja la situación de la célula en el ciclo. (B, David M. Phillips/Visuals Unlimited.)

cesos celulares como el crecimiento celular, la replicación del ADN y la mitosis, han de coordinarse durante el transcurso del ciclo celular. Esto se consigue mediante una serie de puntos de control que regulan la progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular.

Uno de los puntos de regulación principales del ciclo celular, en muchos tipos celulares, se encuentra avanzada la fase G_1 y controla el paso de G_1 a S. Este punto de regulación se definió por primera vez en estudios de la levadura de gemación (*Saccharomyces cerevisiae*), donde se le conoce como **START** (Fig. 16.4). Una vez que las células han rebasado el START, quedan determinadas a entrar en la fase S y a sufrir un ciclo de división celular. Sin embargo, rebasar el punto START es un proceso que está finamente regulado en el ciclo celular de la levadura, siendo controlado a través de señales externas, como la disponibilidad de nutrientes, y por el tamaño celular. Por ejemplo, si las levaduras se enfrentan a una carencia de nutrientes, paran su ciclo celular en START y entran en un estado de reposo en vez de proseguir a la fase S. Así, START supone un punto de decisión en el que la célula determina si hay suficientes nutrientes disponibles para avanzar a través del resto del ciclo celular. Los factores polipeptídicos que intervienen como señales para el apareamiento de las levaduras también detienen el ciclo celular en START, lo que permite fusionarse a las células de levadura haploides en vez de proseguir a la fase S.

Además de servir como un punto de decisión para supervisar señales extracelulares, START es el punto en el que se coordina el crecimiento de la célula con la replicación del ADN y con la división celular. La importancia de esta regulación se muestra de manera evidente en las levaduras de gemación, en las que la división celular da lugar a una progenie de células de distintos tamaños: una célula madre grande y una célula hija pequeña. Para que las células de la levadura mantengan un tamaño constante, la célula hija pequeña debe crecer hasta alcanzar un tamaño mayor al de la célula madre antes de volver a dividirse. Por tanto, se ha de controlar el tamaño de la célula para poder coordinar el crecimiento celular con los otros procesos del ciclo celular. Esta regulación se realiza mediante un mecanismo de control que requiere que la célula alcance un tamaño mínimo para poder rebasar el START. Por tanto, la célula hija pequeña pasa más tiempo en G_1 y crece más que la célula madre.

La proliferación de la mayoría de las células animales también se regula en la fase G_1 del ciclo celular. Concretamente, un punto de decisión de la G_1 avanzada, denominado **punto de restricción** en las células animales, funciona de manera análoga a como lo hace START en las levaduras (Fig. 16.5). Sin embargo, a diferencia de las levaduras, el paso de las células animales a través del ciclo celular se regula, principalmente, por factores de crecimiento

extracelulares que son señales de proliferación celular, en vez de por la disponibilidad de nutrientes. En presencia de los factores de crecimiento apropiados, las células atraviesan el punto de restricción y entran en la fase S. Una vez que la célula ha rebasado el punto de restricción, queda determinada a proseguir a través de la fase S y del resto del ciclo celular, incluso en ausencia de la estimulación por los factores de crecimiento. Por otro lado, si los factores de crecimiento adecuados no están disponibles en G_1, la progresión a través del ciclo celular se para en el punto de restricción. La célula entra en un estado en reposo del ciclo celular denominado G_0 en el que puede permanecer indefinidamente sin proliferar. Las células en G_0 son metabólicamente activas aunque cesa su crecimiento y su ritmo de síntesis de las proteínas es menor. Como ya se ha comentado, muchas células en los animales permanecen en G_0 hasta que son inducidas a proliferar por los factores de crecimiento apropiados o por otras señales extracelulares. Por ejemplo, los fibroblastos de la piel se mantienen detenidos en G_0 hasta que se les estimula a dividirse para reparar el daño causado por una herida. La proliferación de estas células se activa por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, que es liberado por las plaquetas de la sangre durante la coagulación sanguínea y actúa como una señal para la proliferación de los fibroblastos en la proximidad del tejido dañado.

Aunque la proliferación de la mayoría de las células se regula en G_1, algunos ciclos celulares se controlan, en cambio, en G_2. Un ejemplo de esto es el ciclo celular de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (Fig. 16.6). A diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, el ciclo celular de *S. pombe* se regula básicamente a través del control del paso de G_2 a M, que es el punto principal en el que es supervisado el tamaño celular y la disponibilidad de nutrientes. En los animales, el ejemplo más característico de control del ciclo celular en G_2 lo proporcionan los oocitos. Los oocitos de los vertebrados pueden permanecer detenidos en G_2 durante largos períodos de tiempo (varias décadas en el ser humano) hasta que se activa su paso a la fase M, por la estimulación hormonal. De esta manera, las señales extracelulares pueden controlar la proliferación celular regulando el paso de las fases G_2 a M así como de G_1 a S del ciclo celular.

Puntos de control del ciclo celular

Los mecanismos de control tratados en la sección anterior regulan la progresión del ciclo celular en respuesta al tamaño celular y a señales extracelulares, como los nutrientes o los factores de crecimiento. Pero además, los sucesos que tienen lugar durante las diferentes etapas del ciclo celular han de coordinarse entre sí de tal manera que ocurran en el orden adecuado. Por ejemplo, es de la mayor importancia que la célula no entre en mitosis hasta que haya finalizado la replicación del genoma. De lo contrario se produciría una división celular desastrosa, en la que las células hijas no heredarían una

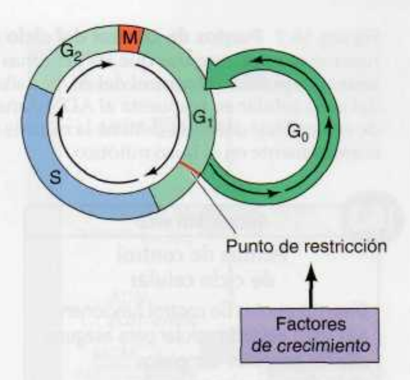
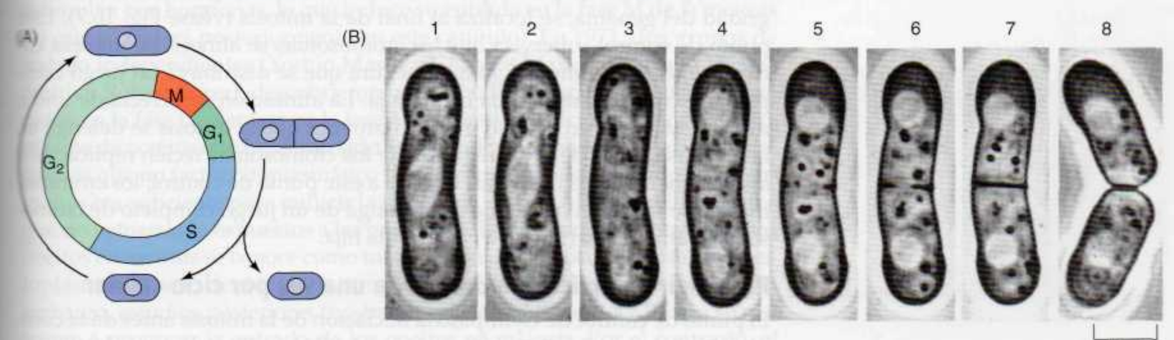


Figura 16.5 Regulación del ciclo de las células animales por factores de crecimiento. La disponibilidad de factores de crecimiento controla el ciclo de la célula animal en un punto de la fase G_1 avanzada, denominado punto de restricción. Si los factores de crecimiento no están disponibles durante G_1, las células entran en un estado en reposo del ciclo denominado G_0.

Figura 16.6 *Ciclo celular de la* levadura de fisión. (A) Las levaduras de fisión crecen por sus extremos, y se dividen formando una pared que atraviesa la zona media de la célula. A diferencia del ciclo de las levaduras de gemación, el ciclo celular de las levaduras de fisión tiene fases G_1, S, G_2 y M normales. Cabe destacar que la citocinesis tiene lugar en G_1. La longitud de la célula indica su situación en el ciclo. (B) Micrografías al microscopio óptico que muestran sucesivos estadios de la mitosis y de la citocinesis de *Schizosaccharomyces pombe*. (B, cortesía de C. F. Robinow, University of Western Ontario.)



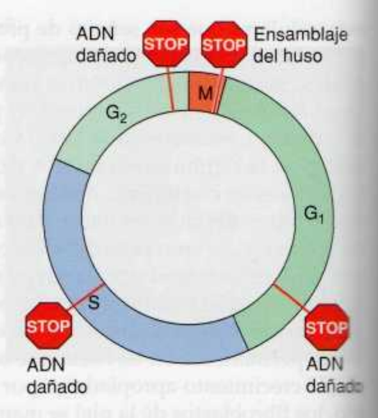
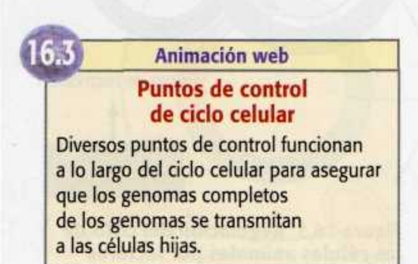


Figura 16.7 Puntos de control del ciclo celular. Varios puntos de control funcionan para asegurar que los genomas completos se transmiten a las células hijas. Los puntos de control del ADN dañado en G_1, S y G_2, dan lugar a la detención del ciclo celular en respuesta al ADN dañado o sin replicar. El punto de control de ensamblaje del huso detiene la mitosis si los cromosomas no están alineados correctamente en el huso mitótico.



copia completa del material genético. En la mayoría de las células, esta coordinación entre las diferentes fases del ciclo celular depende de un sistema **puntos de control** que previenen la entrada en la siguiente fase del ciclo celular hasta que los eventos de la fase precedente hayan sido completados.

Varios puntos de control del ciclo celular, denominados **puntos de control de daños al ADN**, garantizan que el ADN dañado no se replicará ni se transmitirá a las células hijas (Fig. 16.7). Estos puntos de control detectan secuencias de ADN dañado o replicado parcialmente y coordinan la progresión del ciclo celular para completar la replicación o la reparación del ADN. Los puntos de control de daños al ADN funcionan en las fases G_1, S y G_2 del ciclo celular. Por ejemplo, el punto de control de G_2 impide el comienzo de la mitosis en tanto en cuanto la célula no haya completado la replicación o reparado las lesiones existentes. El ADN dañado activa una vía de señalización que da lugar a la detención del ciclo celular. Por consiguiente, este punto de control G_2 impide la iniciación de la fase M hasta que la compleción de la replicación y la reparación de todas las lesiones del ADN. Sólo entonces desaparece la inhibición de la progresión de la fase G_2 y se permite el comienzo de la mitosis y la distribución de los cromosomas completamente replicados entre ambas células hijas. De manera similar, la parada en el punto de control G_1 hace posible la reparación de cualquier lesión en el ADN con anterioridad al inicio de la fase S, en la que tendría lugar la replicación del ADN dañado. El punto de control de la fase S no solamente asegura una monitorización continua de la integridad del ADN para asegurar la reparación del ADN dañado con anterioridad a su replicación, sino que también representa un mecanismo de control de calidad que favorece la reparación de cualquier error producido en el transcurso de la replicación del ADN, como la incorporación de bases incorrectas o la replicación incompleta de secuencias del ADN.

Otro punto de control importante del ciclo celular, que mantiene la integridad del genoma, se localiza al final de la mitosis (véase Fig. 16.7). Este punto de control supervisa que los cromosomas se alineen de manera correcta en el huso mitótico, lo que asegura que se distribuya un juego completo de cromosomas a cada célula hija. La alineación incorrecta de uno o más cromosomas en el huso mitótico provoca que la mitosis se detenga en la metafase, antes de la segregación de los cromosomas recién replicados a los núcleos de las células hijas. Gracias a este punto de control, los cromosomas no se segregan hasta que se disponga de un juego completo de cromosomas para ser distribuido a cada célula hija.

Restringir la replicación del ADN a una vez por ciclo celular

El punto de control de G_2 impide la iniciación de la mitosis antes de la compleción de la fase S, asegurando así que el ADN replicado incompletamente

no se transmita a las células hijas. También es importante asegurar que el genoma sólo se replica una vez en cada ciclo celular. Así, una vez que un segmento de ADN ha sido replicado durante la fase S, deben existir mecanismos de control que impidan la reiniciación de la replicación del ADN hasta que se haya completado el ciclo celular y la célula haya pasado por la mitosis. Como se dijo en el Capítulo 6, las células de mamífero emplean miles de orígenes para replicar su ADN, de modo que la iniciación de la replicación de cada uno de estos orígenes debe ser cuidadosamente controlada, para que cada segmento del genoma sólo se replique una vez durante la fase S de cada ciclo celular.

El mecanismo molecular que restringe la replicación del ADN a una vez por ciclo celular implica la acción de una familia de proteínas (denominadas proteínas MCM) que se unen a los orígenes de replicación junto con las proteínas del complejo del origen de replicación (ORC) (véase Fig. 6.15). Las proteínas MCM se controlan a través de «factores licenciadores» que permiten que se inicie la replicación (Fig. 16.8). Su unión al ADN está regulada durante el ciclo celular, de modo que las proteínas MCM sólo son capaces de unirse a los orígenes de replicación durante G_1, permitiendo que se inicie la replicación del ADN cuando la célula entre en la fase S. Una vez que se ha producido la iniciación, las proteínas MCM son desplazadas del origen, de forma que la replicación no puede iniciarse otra vez hasta que la célula pase por mitosis y entre en la fase G_1 del siguiente ciclo celular. La asociación de proteínas MCM con el ADN durante las fases S, G_2 y M del ciclo celular está bloqueada por la actividad de proteínas quinasas que regulan la progresión del ciclo celular, tal como se describe en la siguiente sección de este capítulo.

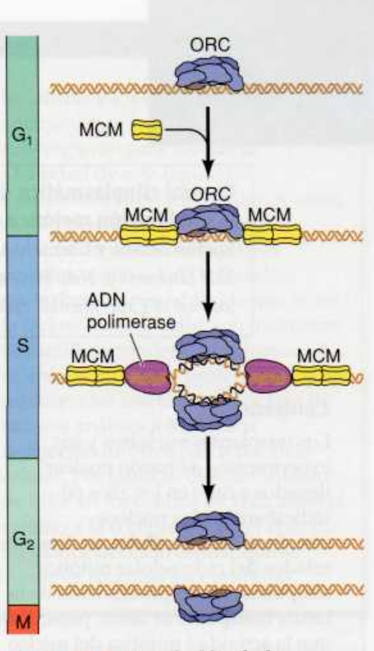


Figura 16.8 Restricción de la replicación del ADN. La replicación del ADN se restringe a una vez por cada ciclo celular debido a las proteínas MCM, que se unen a los orígenes de replicación junto con las proteínas ORC (complejo del origen de replicación) y que se requieren para la iniciación de la replicación del ADN. Las proteínas MCM sólo son capaces de unirse al ADN en G_1, lo que permite que la replicación del ADN comience en la fase S. Una vez que se ha producido
la iniciación, las proteínas MCM se desplazan de su origen, de tal manera que la replicación no se puede iniciar otra vez hasta después de la mitosis.

Reguladores de la progresión del ciclo celular

Uno de los descubrimientos más interesantes de la pasada década ha sido el esclarecimiento *de los mecanismos moleculares que controlan la progresión* de las células eucariotas a través del ciclo de división celular. Nuestro conocimiento actual de la regulación del ciclo celular se debe a la convergencia de resultados obtenidos mediante experimentos con organismos tan distintos como las levaduras, erizos de mar, ranas y mamíferos. Estos estudios han revelado que el ciclo celular de todos los eucariotas está controlado por un conjunto de proteína quinasas, conservado en los distintos organismos, que son las responsables de inducir el paso de un estado del ciclo celular a otro.

Proteínas quinasas y la regulación del ciclo celular

Tres abordajes experimentales diferentes contribuyeron a identificar las moléculas clave responsables de la regulación del ciclo celular. La primera de estas líneas de investigación tenía como base los estudios con oocitos de rana (Fig. 16.9). Estos oocitos se detienen en la fase G_2 del ciclo celular hasta que se estimulan por hormonas, lo que induce su entrada en la fase M de la meiosis (lo que se tratará posteriormente en este capítulo). En 1971, dos grupos de trabajo independientes (Yoshio Masui y Clement Marker, así como Dennis Smith y Robert Ecker), descubrieron que se podía inducir a los oocitos detenidos en la fase G_2 a entrar en la fase M mediante la microinyección del citoplasma de oocitos que hubieran sido estimulados hormonalmente. Por tanto, parecía que un factor citoplasmático presente en los oocitos tratados con hormonas era suficiente para inducir la transición de G_2 a M en aquellos oocitos que no habían sido expuestos a las hormonas. Debido a que la entrada de los oocitos en meiosis se conoce como maduración de los oocitos, a este factor citoplasmático se le denominó **factor promotor de la maduración (MPF)**. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la actividad del MPF no se restringe a provocar la entrada de los oocitos en meiosis. Por el contrario, el



EXPERIMENTO CLAVE

Descubrimiento del MPF

Control citoplasmático del comportamiento nuclear durante la maduración meiótica de los oocitos de rana
Yoshio Masui y Clement L. Markert
Yale University, New Haven, CT
Journal of Experimental Zoology, 1971, Volumen 177, págs. 129-146


Yoshio Masui


Clement Markert

Contexto

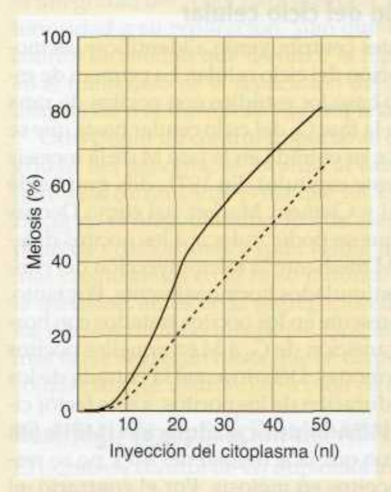
Los trasplantes nucleares y los experimentos de fusión nuclear llevados a cabo en los años 60 indicaban que los núcleos transferidos a las células en diferentes estados del ciclo celular mitótico adoptaban el comportamiento de la célula huésped. Por tanto, parecía ser que la actividad mitótica del núcleo era regulada por el citoplasma. Sin embargo, el postulado de la existencia de factores citoplasmáticos que controlaban la actividad mitótica del núcleo requería demostrarse mediante un abordaje experimental directo. Esta demostración la proporcionaron los estudios de Masui y Markert, que investigaron el papel de los factores citoplasmáticos en la regulación del comportamiento nuclear durante la meiosis de los oocitos de rana.

Varias características de la meiosis de los oocitos de rana sugerían que esta era controlada por factores citoplasmáticos. Concretamente, la meiosis de los oocitos de rana se detiene al final de la profase de la meiosis I. El tratamiento con la hormona progesterona provoca la reanudación de la meiosis, lo que equivale al paso de G_2 a M en las células somáticas. Entonces los oocitos sufren una segunda parada en la metafase de la meiosis II, donde permanecen hasta la fecundación. Masui y Markert propusieron la hipótesis de que tanto los efectos en la meiosis del tratamiento hormonal como los de la fecundación se debían a variaciones en el citoplasma que controlaban de manera indirecta el comportamiento del núcleo. Comprobaron directamente esta hipótesis transfiriendo el citoplasma de los oocitos estimulados con hormonas a los oocitos que no habían sido estimulados. Estos experimentos demostraron que un factor citoplasmático, que Masui y Markert denominaron factor promotor de la maduración (MPF), es el responsable de la inducción de la meiosis tras el tratamiento hormonal.

Experimentos

Debido a su gran tamaño y a su capacidad de sobrevivir a la inyección mediante micropipetas de cristal, los oocitos de rana constituían un sistema experimental adecuado para comprobar la actividad de los factores citoplasmáticos. El diseño básico de los experimentos de Masui y Markert consistía en quitar el citoplasma de los oocitos donantes que habían sido tratados con progesterona para inducir la reanudación de la meiosis. Cantidades variables de este citoplasma se inyectaron en oocitos receptores que no habían sido tratados. El resultado clave fue que el citoplasma de los oocitos donantes que había sido retirado seis o más horas después del tratamiento hormonal indujo la reanudación de la meiosis en los receptores inyectados (véase figura). Por el contrario, la inyección del citoplasma de oocitos control que no habían sido expuestos a la progesterona no tuvo efecto sobre los receptores. Por tanto, parecía que los oocitos tratados con hormonas contenían un factor citoplasmático que podía inducir la reanudación de la meiosis en aquellos receptores que nunca habían sido expuestos a la progesterona.

Los experimentos de control permitieron desechar la posibilidad de que fuera la propia progesterona el factor inductor de la meiosis en el citoplasma donante. En concreto, se demostró que la inyección de progesterona en oocitos receptores no inducía la meiosis. Sólo la aplicación externa de la hormona es eficaz, lo que indica que la progesterona actúa



Los oocitos receptores se inyectaron con las cantidades que se indican de citoplasma de oocitos que habían sido tratados con progesterona. El citoplasma donante se obtuvo de la región central del oocito con una micropipeta (línea continua) o a partir de un homogeneizado de oocitos enteros (línea discontinua). Los resultados se presentan como el porcentaje de oocitos inyectados en los que se indujo la reanudación de la meiosis.

EXPERIMENTO CLAVE

sobre un receptor celular de la superficie activando a un factor citoplasmático diferente. Experimentos similares realizados independientemente por Dennis Smith y Robert Ecker (*La interacción de los esteroides con los oocitos de Rana pipiens en la inducción de la maduración*. *Dev. Biol.* 25: 232-247, 1971) condujeron a la misma conclusión.

Es de destacar que la acción de la progesterona en este sistema difiere de su acción en la mayoría de las células, donde difunde a través de la membrana plasmática y se une a un receptor intracelular (véase Cap. 15). Sin embargo, en los oocitos la progesterona actúa claramente sobre la superficie celular, activando un factor diferente en el citoplasma del oocito. Puesto que la reanudación de la meiosis del oocito se conoce comúnmente como la maduración del oocito, Masui y Markert acuñaron el término «factor promotor de la maduración» para el regulador de la meiosis recién descubierto.

Impacto

Tras su descubrimiento en los oocitos de rana, también se encontró el MPF en las células somáticas, donde induce el paso de G_2 a M en la mitosis. Por tanto, el MPF parecía ser un regulador general de la entrada a la fase M tanto en el ciclo celular meiótico como mitótico. La purificación definitiva del MPF de oocitos de rana en 1988, la genética de levaduras y los estudios en embriones de erizo de mar, convergieron para revelar la identidad de este regulador fundamental del ciclo celular. A saber, el MPF resultó ser un dímero constituido por la ciclina B y la proteína quinasa Cdk1. Estudios posteriores han establecido que tanto la ciclina B como Cdk1 son miembros de familias grandes de proteínas; diferentes ciclinas y proteína quinasas relacionadas con Cdk1 funcionan de manera análoga a MPF en la regulación de otros pasos del ciclo celular. Por tanto, el descubrimiento de MPF en los oocitos de rana abrió el camino a la comprensión del aparato regulador del ciclo celular que se conserva en todos los eucariotas.

MPF también se encuentra en las células somáticas, donde induce la entrada a la fase M del ciclo mitótico. Por tanto, parecía que MPF, en vez de ser específico de los oocitos, era un regulador general del paso de G_2 a M.

El segundo abordaje para comprender la regulación del ciclo celular fue el análisis genético de levaduras, del cual fueron pioneros Lee Hartwell y cols. a principios de los años 70. Estudiando la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, estos investigadores identificaron mutantes sensibles a la temperatura que eran defectuosos en la progresión del ciclo celular. La característica principal de estos mutantes (denominados *cdc* por mutantes del *c*iclo de *d*ivisión *c*elular) era que se detenía su crecimiento en determinados puntos del ciclo celular. Por ejemplo, un mutante particularmente importante designado como *cdc28* detenía el ciclo celular en START, lo que indicaba que se necesitaba la proteína Cdc28 para rebasar este punto crítico de regulación en G_1 (Fig. 16.10). Paul Nurse y cols. aislaron una colección similar de mutantes del ciclo celular en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Entre estos mutantes se encontraba *cdc2*, que detenía el ciclo celular de *S. pombe* tanto en G_1 como en el paso de G_2 a M (que es el principal punto de regulación en la levadura de fisión). Estudios posteriores mostraron que *cdc28* de *S. cerevisiae* y *cdc2* de *S. pombe* son genes funcionalmente homólogos, que se requieren para atravesar START así como para entrar en mitosis en ambas especies de levaduras. Estudios posteriores demostraron que *cdc2* y *cdc28* codifican una proteína quinasa —la primera indicación de un papel prominente de la fosforilación proteica en la regulación del ci-

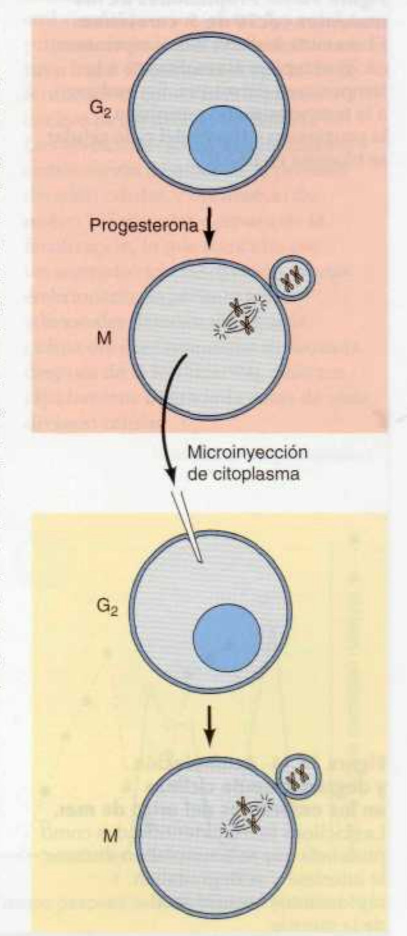


Figura 16.9 Identificación del MPF. Los oocitos de rana se detienen en la fase G_2 del ciclo celular, y la hormona progesterona provoca su entrada en la fase M de la meiosis. En el experimento que aquí se ilustra, a los oocitos detenidos en G_2 se les microinyectó citoplasma extraído de oocitos que habían sufrido la transición de G_2 a M. Esta transferencia citoplasmática indujo el paso de G_2 a M en ausencia del estímulo hormonal, lo que demostraba que era suficiente un factor citoplasmático (MPF) para inducir la entrada en la fase M de la meiosis.

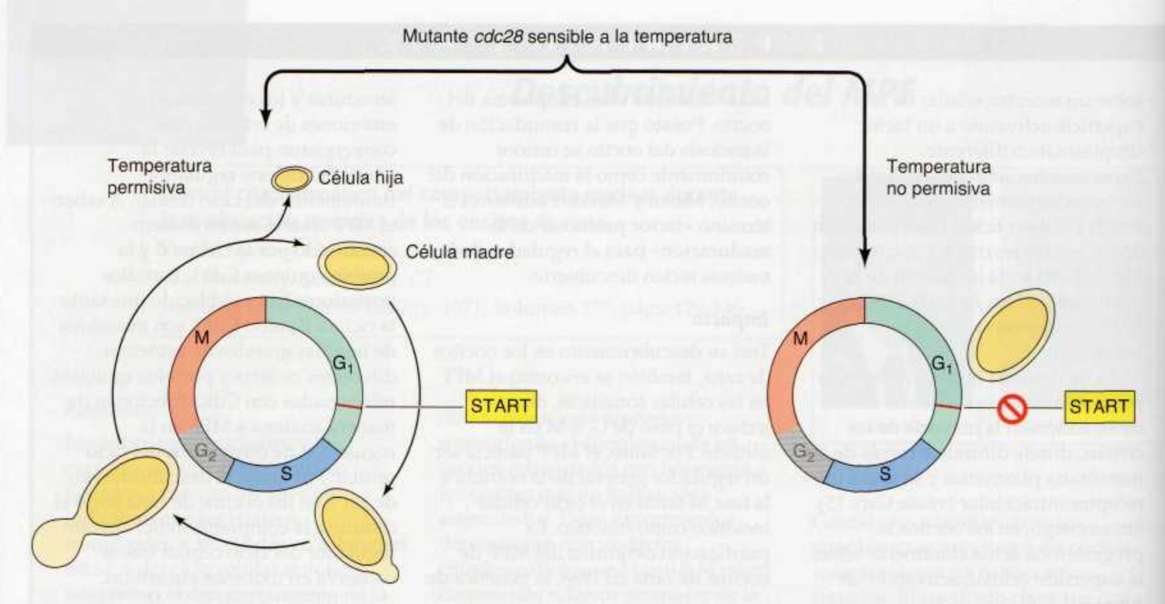


Figura 16.10 Propiedades de los mutantes *cdc28* de *S. cerevisiae.* El mutante sensible a la temperatura *cdc28* se replica normalmente a la temperatura permisiva. Sin embargo, a la temperatura no permisiva la progresión a través del ciclo celular se bloquea en START.

clo celular—. Adicionalmente, genes relacionados fueron identificados en otros eucariotas, incluidos en el hombre. La proteína quinasa codificada por los genes de levadura *cdc2* y *cdc28* ha demostrado ser un regulador conservado del ciclo celular en todos los eucariotas, conocido como **Cdk1**.

Por último, la tercera línea de investigación, que convergía con la identificación del MPF y con la genética de levaduras, vino de estudios sobre la síntesis de proteínas en embriones tempranos de erizo de mar. Tras la fecundación, estos embriones sufren una serie de divisiones celulares rápidas. Sorprendentemente, los estudios con inhibidores de la síntesis de proteínas mostraban que la entrada en la fase M en estos ciclos celulares embrionarios requería una nueva síntesis de proteínas. En 1983, Tim Hunt y cols. identificaron dos proteínas que mostraban un patrón periódico de acumulación y degradación en embriones de erizo de mar y de almeja. Estas proteínas se acumulaban durante la interfase y eran degradadas rápidamente al final de cada mitosis (Fig. 16.11). Hunt llamó a estas proteínas **ciclinas** (las dos proteínas fueron designadas como ciclina A y ciclina B) y sugirió que podían ser inductores de la mitosis, y que su acumulación y degradación periódica controlaría la entrada y la salida de la fase M. El papel propuesto para las ciclinas se confirmó en 1986 cuando Joan Ruderman y cols. mostraron que bastaba con la microinyección de la ciclina A en oocitos de rana para inducir el paso de G_2 a M.

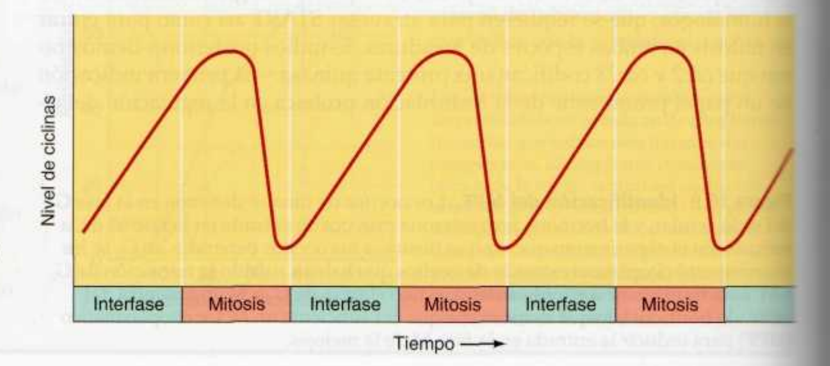


Figura 16.11 Acumulación y degradación de ciclinas en los embriones del erizo de mar. Las ciclinas fueron identificadas como proteínas que se acumulaban durante la interfase y se degradaban rápidamente hacia el final de la mitosis.

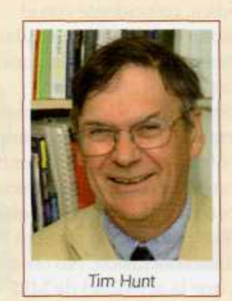


EXPERIMENTO CLAVE

La identificación de la ciclina

Ciclina: una proteína determinada por el ARNm materno en los oocitos de erizo de mar que es destruida con cada escisión de la división

Tom Evans, Eric T. Rosenthal, Jim Youngblom, Dan Distel, y Tim Hunt
Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA
Cell, 1983, Volumen 33, págs. 389-396


Tim Hunt

Contexto

Tim Hunt y cols. analizaron la síntesis proteica en los oocitos de erizo de mar después de la fertilización, con la meta de identificar proteínas recién sintetizadas que pudieran ser necesarias para la división celular durante el desarrollo embrionario. Una diversidad de experimentos anteriores habían demostrado que la traducción de ARNm maternos almacenados en los oocitos sin fertilizar, estaba activada por la fertilización, dando lugar a cambios llamativos en el perfil de síntesis proteica después de la fertilización. Adicionalmente, los estudios con inhibidores de la traducción habían establecido que la síntesis proteica era necesaria para la división celular durante el desarrollo embrionario temprano. Por ejemplo, la inhibición de la síntesis proteica después de la fertilización de los oocitos de erizo de mar bloqueaba la degradación de la envuelta nuclear, la condensación cromosómica, la formación del huso. Estos resultados sugerían que las divisiones celulares embrionarias requerían proteínas que eran sintetizadas a partir de ARNm maternos en los oocitos fertilizados.

Mediante estudios de síntesis proteica en oocitos fertilizados, Hunt y cols. esperaban, por tanto, identificar proteínas recién sintetizadas que estuviesen implicadas en la división celular. Sus experimentos dieron lugar a la identificación de las ciclinas y a la dilucidación del mecanismo fundamental que dirige el ciclo de división de las células eucariotas.

Experimentos

Oocitos de erizo de mar fertilizados y sin fertilizar fueron incubados en presencia de metionina radioactiva, y los extractos celulares fueron analizados mediante electroforesis en gel para identificar proteínas recién sintetizadas. Se encontró que diversas proteínas prominentes eran sintetizadas en los oocitos fertilizados, tal y como se había descrito en los oocitos de otros organismos. Adicionalmente, un análisis exhaustivo del perfil de las proteínas marcadas radiactivamente en diferentes momentos después de la fertilización, dio un resultado sorprendente. Mediante el análisis de las proteínas presentes en intervalos de tiempo de 10 minutos, después de la fertilización, Hunt y cols. identificaron una proteína que era prominente en oocitos recién fertilizados, pero que prácticamente desaparecía 85 minutos después de la fertilización. Esta proteína se hacía abundante de nuevo 95 minutos después de la fertilización, y desaparecía de nuevo 30 minutos más tarde. Debido a estas oscilaciones cíclicas en su abundancia, la proteína se denominó «ciclina».

Otro resultado llamativo era el obtenido cuando las oscilaciones de los niveles de ciclina eran comparados con las divisiones celulares durante el desarrollo de los embriones de erizo (véase figura). La primera división del oocito fertilizado tuvo lugar 85 minutos después de la fertilización, coincidiendo con el declive de los niveles de ciclina. Los niveles de ciclina aumentaban a continuación después de la primera división celular, y declinaban de nuevo 125 minutos después de la fertilización, lo que coincidía con un segundo ciclo de división celular embrionaria. Experimentos adicionales demostraron que la ciclina era continuamente sintetizada después de la fertilización, pero era rápidamente degradada antes de cada división celular.

(Continúa en la página siguiente)



Oocitos de erizo de mar fueron fertilizados y metionina radioactiva fue añadida 5 minutos después de la fertilización. Las muestras fueron recogidas a intervalos de 10 minutos y analizadas mediante electroforesis en gel para determinar los niveles de ciclina. En paralelo, las muestras fueron examinadas microscópicamente para cuantificar el porcentaje de células que sufrían división celular.

EXPERIMENTO CLAVE

Impacto

Basándose en su degradación periódica, coincidente con el comienzo de la división celular embrionaria, Hunt y cols. concluyeron que era «difícil creer que el comportamiento de las ciclinas no esté conectado con los procesos implicados en la división celular». Sin embargo, en la ausencia de experimentos que demostrasen la actividad biológica de la ciclina, no poseían pruebas directas para esta conclusión. No obstante, se sabía que la actividad de MPF oscilaba de forma similar durante el ciclo celular, y experimentos adicionales demostraron que la formación de MPF activa requería síntesis proteica. Estas similitudes entre MPF y la ciclina llevaron a Hunt y cols. a sugerir una relación directa entre MPF, definida como una actividad biológica, y la ciclina, definida como una proteína cuyos niveles oscilaban durante la progresión del ciclo celular.

Experimentos posteriores de Joan Ruderman y cols. demostraron que la inyección de ciclina era suficiente para inducir la entrada de los oocitos de rana en meiosis, demostrando que la ciclina poseía la actividad biológica de MPF. La relación biológica entre la ciclina y MPF fue establecida a continuación mediante la purificación de MPF a partir de oocitos de rana en el laboratorio de James Maller y la caracterización consiguiente de MPF como un dímero de ciclina B y Cdk1. La degradación periódica de la ciclina B, descubierta por Tim Hunt y cols., controla la a ctividad de Cdk1 durante la entrada y salida de mitosis. Adicionalmente, otras ciclinas juegan papeles similares en la regulación de transiciones entre otras fases del ciclo celular. El descubrimiento de la ciclina como una proteína oscilante en los embriones del erizo de mar fue, por tanto, la clave de la dilucidación de la base molecular de la regulación del ciclo celular.

Estos abordajes independientes convergieron de manera espectacular en 1988, cuando se purificó el MPF a partir de oocitos de rana en el laboratorio de James Maller. La caracterización molecular del MPF en varios laboratorios mostró que este regulador conservado del ciclo celular está compuesto por dos subunidades fundamentales: Cdk1 y ciclina B (Fig. 16.12). La ciclina B es una subunidad reguladora que se requiere para la actividad catalítica de la proteína quinasa Cdk1, lo que concuerda con el hecho de que la actividad de MPF está controlada por la acumulación y degradación periódica de la ciclina B durante el transcurso del ciclo celular.

Diversos estudios posteriores han confirmado este papel de la ciclina B, así como la regulación del MPF mediante la fosforilación y la desfosforilación de Cdk1 (Fig. 16.13). En las células de mamífero, la ciclina B es sintetizada y forma complejos con Cdk1 durante G_2. A medida que se forman estos complejos, la Cdk1 es fosforilada en dos posiciones reguladoras críticas. Una de estas fosforilaciones ocurre en la treonina-161 y es necesaria para la actividad de la Cdk1 quinasa. La segunda es una fosforilación de la tirosina-15 y de la proteína quinasa adyacente Wee1, que inhibe la actividad de Cdk1 y da lugar a la acumulación de complejos de Cdk1/ciclina inactivos durante la fase G_2. La transición de G_2 a M se produce a continuación mediante la activación del complejo Cdk1/ciclina B como resultado de la desfosforilación de la treonina-14 y tirosina-15 por la acción de una proteína fosfatasa denominada Cdc25.

Una vez activada, la proteína quinasa Cdk1 fosforila varias proteínas diana que inician la fase M, lo que se tratará posteriormente en este capítulo. Además, la actividad de Cdk1 provoca la degradación de la ciclina B, que se produce por una proteólisis mediada por ubiquitina. Esta destrucción proteolítica de la ciclina B inactiva a Cdk1, lo que lleva a la célula a salir de la mitosis, a sufrir la citocinesis, y a volver a la interfase.

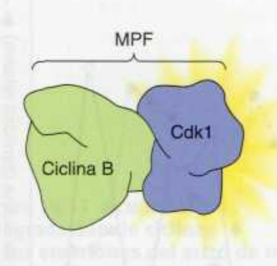


Figura 16.12 Estructura del MPF. El MPF es un dímero constituido por la ciclina B y por la proteína quinasa Cdk1.

Familias de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas

La estructura y función de MPF (Cdk1/ciclina B) no sólo proporciona una base molecular para comprender la entrada y salida de la fase M, sino también las bases para dilucidar la regulación de otros pasos del ciclo celular. La información que proporcionó la caracterización del complejo Cdk1/ciclina B

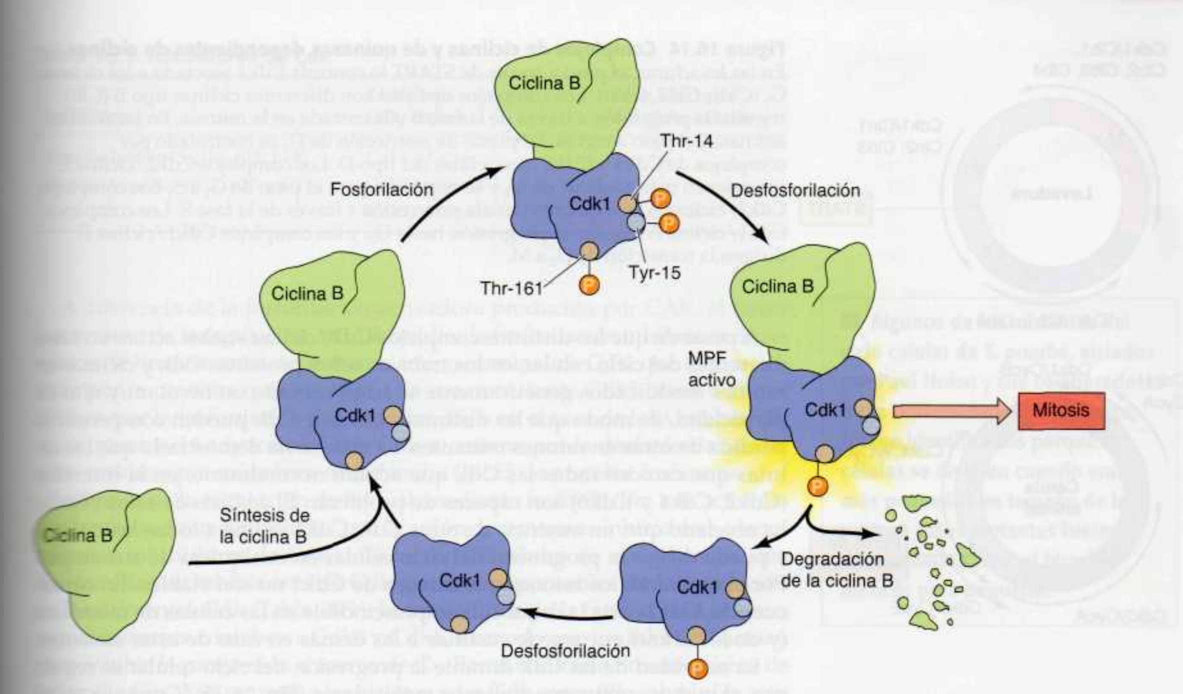


Figura 16.13 Regulación del MPF. Cdk1 forma complejos con la ciclina B durante G_2. Entonces Cdk1 es fosforilada en la treonina-161, que se requiere para su actividad, y en la tirosina-15 (y en la treonina-14 en células de vertebrados), lo que inhibe la actividad de Cdk1. La desfosforilación de la Thr-14 y de la Tyr-15 activa a MPF para el paso de G_2 a M. La actividad de MPF termina hacia el final de la mitosis por la degradación proteolítica de la ciclina B.

ha tenido un profundo impacto en la comprensión de la regulación del ciclo celular. En concreto, investigaciones posteriores han establecido que tanto Cdk1 como la ciclina B son miembros de grandes familias de proteínas relacionadas, en las que los diferentes miembros de estas familias controlan la progresión a través de las distintas fases del ciclo celular.

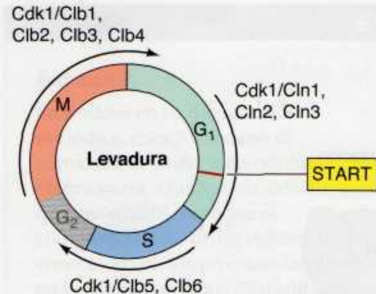
Como ya se trató anteriormente, Cdk1 controla el paso a través de START así como la entrada en mitosis en las levaduras. Sin embargo, esto lo hace en asociación con diferentes ciclinas (Fig. 16.14). Concretamente, la transición de G_2 a M la lleva a cabo Cdk1 junto con las ciclinas mitóticas de tipo B (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4). Sin embargo, el paso a través de START lo controla Cdk1 en asociación con una clase diferente de ciclinas denominadas **ciclinas G_1** o **Cln's**. Entonces Cdk1 se asocia con un tipo diferente de ciclinas B (Clb5 y Clb6), que se requieren para la progresión a través de la fase S. Estas asociaciones de Cdk1 con diferentes ciclinas del tipo B y G_1 provocan la fosforilación por Cdk1 de diferentes proteínas sustrato, lo que se requiere para la progresión a través de las fases específicas del ciclo celular.

Los ciclos celulares de los eucariotas superiores se controlan, no solamente por múltiples ciclinas, sino también por múltiples proteína quinasas relacionadas con Cdk1, que se conocen como **Cdk**, de quinasas dependientes de ciclina. Todos estos miembros de la familia Cdk se asocian con ciclinas específicas para llevar a cabo la progresión a través de los diferentes estados del ciclo celular (véase Fig. 16.14). Por ejemplo, el paso de G_1 a S se regula principalmente por Cdk2, Cdk4 y Cdk6 en asociación con las ciclinas D y E. Los complejos de Cdk4 y Cdk6 con las ciclinas de tipo D (ciclina D1, D2 y D3) desempeñan un papel crítico en la progresión a través del punto de restricción en G_1. Las ciclinas de tipo E (E1 y E2) se expresan posteriormente en G_1, y los complejos Cdk2/ciclina E se requieren para el paso de G_1 a S y el inicio de la síntesis del ADN. Los complejos de Cdk2 con ciclinas de tipo A (A1 y A2) funcionan en la progresión de las células a través de la fase S. A continuación Cdk1 regula el paso desde S a G_2 y desde G_2 a M formando complejos con ciclinas de tipo A y tipo B (B1, B2, y B3), respectivamente.

16.4 Animación web

Ciclinas, Cdk y el ciclo celular

El factor promotor de la maduración (MPF) –formado por la ciclina B y Cdk1– regula la transición desde la fase G_2 a la M del ciclo celular.



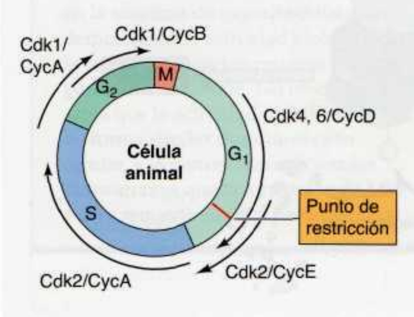


Figura 16.14 Complejos de ciclinas y de quinasas dependientes de ciclinas. En las levaduras, el paso a través de START lo controla Cdk1 asociado a las ciclinas G_1 (Cln1, Cln2, Cln3). Los complejos de Cdk1 con diferentes ciclinas tipo B (Clb) regulan la progresión a través de la fase S y la entrada en la mitosis. En las células animales, el paso a través del punto de restricción de G_1 es controlado por complejos de Cdk4 y Cdk6 con ciclinas del tipo D. Los complejos Cdk2/ciclina E intervienen más adelante en G_1 y se requieren para el paso de G_1 a S. Los complejos Cdk2/ciclina A se requieren para la progresión a través de la fase S. Los complejos Cdk1/ciclina A regulan la progresión hasta G_2, y los complejos Cdk1/ciclina B dirigen la transición de G_2 a M.

A pesar de que los distintos complejos Cdk/ciclina suelen actuar en fases diferentes del ciclo celular, en los trabajos sobre proteínas Cdk y ciclinas en ratones modificados genéticamente se ha observado un nivel muy alto de plasticidad, de modo que las distintas ciclinas y Cdk pueden compensar la pérdida de otras en ratones mutantes. Es más, se ha demostrado que las células que carecen todas las Cdk que actúan normalmente en la interfase (Cdk2, Cdk4 y Cdk6) son capaces de proliferar. El análisis de estas células ha revelado que, en ausencia de otras Cdk, Cdk1 se une a todas las ciclinas y puede dirigir la progresión del ciclo celular en cualquiera de sus etapas. Por el contrario, los ratones que carecen de Cdk1 no son viables. En consecuencia, Cdk1 sería la única Cdk imprescindible en las células de mamífero (y de levadura) que puede sustituir a las demás en caso de estar ausentes.

La actividad de las Cdk durante la progresión del ciclo celular se regula por, al menos, cuatro mecanismos moleculares (Fig. 16.15). Como ya se ha tratado en el caso de Cdk1, el primer nivel de regulación implica la asociación de las Cdk con las ciclinas correspondientes. Así, la formación de los complejos específicos Cdk/ciclina está controlada por la síntesis y degradación de las ciclinas. En segundo lugar, la activación de los complejos Cdk/ciclina requiere la fosforilación de un residuo de treonina de la Cdk conservado alrededor de la posición 160. Esta fosforilación que activa la Cdk está catalizada por una enzima denominada CAK (de quinasa activadora de Cdk), que a su vez está constituida por una Cdk (Cdk7) unida con la ciclina H. Los complejos de Cdk7 y ciclina H se asocian con el factor de transcripción TFIIH, que se requiere para la iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II (véase Cap. 6), de forma que este miembro de la familia Cdk participa en la transcripción además de en la regulación del ciclo celular.

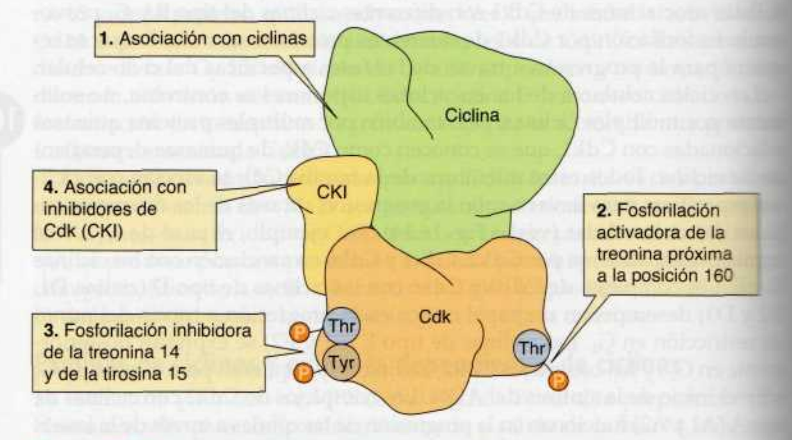


Figura 16.15 Mecanismos de regulación de Cdk. Las actividades de las Cdk se regulan por cuatro mecanismos moleculares.

Tabla 16.1 Inhibidores de Cdk

Inhibidor	Complejo Cdk/ciclina	Fase afectada del ciclo celular
Familia Ink4 (p15, p16, p18, p19)	Cdk4 y Cdk6	G_1
Familia Cip/Kip (p21, p27, p57)	Cdk2/ciclina E	G_1
	Cdk2/ciclina A	S

A diferencia de la fosforilación activadora producida por CAK, el tercer mecanismo de la regulación de Cdk implica la fosforilación inhibidora de residuos de tirosina cerca del extremo amino terminal de Cdk, que está catalizada por la proteína quinasa Wee1. En concreto, tanto Cdk1 como Cdk2 se inhiben por la fosforilación de la tirosina-15, y en el caso de los vertebrados, de la treonina-14 adyacente. Estas Cdk se activan por la desfosforilación de estos residuos por miembros de la familia Cdc25 de proteína fosfatasas.

■ Algunos de los mutantes del ciclo celular de *S. pombe*, aislados por Paul Nurse y sus colaboradores en la Universidad de Edimburgo, fueron identificados porque las células se dividían cuando eran más pequeñas en tamaño de lo normal. Estos mutantes fueron denominados Wee, el término escocés para pequeño.

Además de la regulación de las Cdk mediante fosforilación, sus actividades también están controladas por la unión de proteínas inhibidoras (denominadas **inhibidores de Cdk** o **CKIs**). En las células de mamífero, existen dos familias de inhibidores de Cdk que son responsables de la regulación de las diferentes Cdk (Tabla 16.1). Los miembros de la familia Ink4 se unen específicamente e inhiben a Cdk4 y Cdk6, de modo que los Ink4 CKI actúan para inhibir la progresión a través de G_1. Por el contrario, los miembros de la familia Cip/Kip se unen a las ciclinas y las Cdk y pueden inhibir las actividades de proteína quinasa de los distintos complejos ciclina/Cdk. No obstante, los efectos de las proteínas Cip/Kip en distintos complejos ciclina/Cdk están sometidos a una regulación diferencial. Por ejemplo, las proteínas Cip/Kip facilitan el ensamblaje de complejos de Cdk4 y Cdk6 con la ciclina D, de modo que estimulan, en lugar de inhibir, la actividad de estas Cdk. De manera similar, la regulación de los efectos de las proteínas Cip/Kip en los complejos Cdk1/ciclina B es tal que bajo ciertas condiciones las proteínas Cip/Kip actúan favoreciendo la transición de la fase G_2 a la fase M, en mayor medida que inhibiéndola. Sin embargo, las proteínas Cip/Kip suelen inhibir la formación de complejos de Cdk2 con ciclina A o ciclina E, por lo que impiden la progresión de las fases G_1 y S del ciclo celular. Por ello, el control de las proteínas Ink4 y Cip/Kip supone un mecanismo adicional de regulación de la actividad de las Cdk. Los efectos combinados de todos estos tipos de regulación de Cdk son los responsables del control de la progresión del ciclo celular en respuesta tanto a los puntos de control como a la variedad de los estímulos extracelulares que regulan la proliferación celular.

Factores de crecimiento y la regulación de las Cdk de G_1

Como ya se trató anteriormente, la proliferación de las células animales se regula principalmente mediante diversos factores de crecimiento extracelulares que controlan la progresión de las células a través del punto de restricción en las postrimerías de G_1. En ausencia de los factores de crecimiento las células son incapaces de rebasar el punto de restricción y, en lugar de ello, se inactivan, con lo que suelen entrar en el estado de reposo denominado G_0; desde éste pueden volver a entrar en el ciclo celular al ser estimuladas por los factores de crecimiento. Este control de la progresión del ciclo celular mediante los factores de crecimiento extracelulares implica que las vías de la señalización intracelular que se activan posteriormente (*downstream*) a los receptores de los factores de crecimiento (que se trataron en el capítulo anterior) intervienen, en última instancia, regulando los componentes de la maquinaria del ciclo celular.

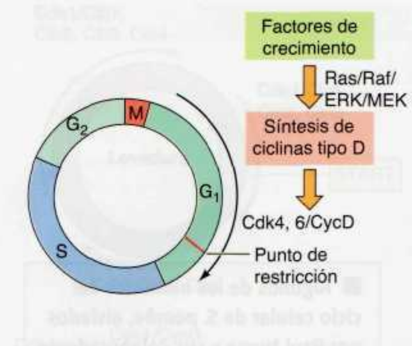


Figura 16.16 Inducción de las ciclinas tipo D. Los factores de crecimiento regulan la progresión del ciclo celular a través del punto de restricción de G_1 induciendo la síntesis de ciclinas tipo D mediante la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK.

Un vínculo importante entre la señalización por los factores de crecimiento y la progresión del ciclo celular son las ciclinas del tipo D (Fig. 16.16). La síntesis de la ciclina D1 se induce en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento, como resultado de la señalización a través de la vía Ras/Raf/MEK/ERK, y la ciclina D1 sigue siendo sintetizada mientras los factores de crecimiento están presentes. Sin embargo, las ciclinas de tipo D1 también se degradan rápidamente, por lo que su concentración intracelular desciende bruscamente en ausencia de los factores de crecimiento. Así, mientras los factores de crecimiento estén presentes durante G_1, los complejos de Cdk4, 6/ciclina D1 hacen que las células atraviesen el punto de restricción. Por otro lado, si se eliminan los factores de crecimiento antes de este punto, los niveles de ciclina D1 descienden rápidamente, y las células no pasan a través de G_1 a S; por el contrario, se inactivan y entran en G_0. Por tanto, la inducción y el rápido recambio de las ciclinas tipo D1 vinculan la señalización por factores de crecimiento con la maquinaria del ciclo celular, lo que permite a los factores de crecimiento extracelulares controlar la progresión de las células a través de G_1.

Puesto que la ciclina D1 es una diana importante de la señalización por factores de crecimiento, se podría esperar que las alteraciones en la regulación de la ciclina D1 alteraran la regulación del crecimiento celular, característica de las células cancerosas. Así, se ha encontrado que la causa de muchos cánceres humanos es una regulación defectuosa del ciclo celular, al igual que la causa de muchos otros son alteraciones en las vías de señalización intracelular activadas por los receptores de los factores de crecimiento (véase Cap. 15). Por ejemplo, las mutaciones que dan lugar a una expresión continua de la ciclina D1 contribuyen al desarrollo de varios tipos de cánceres humanos, entre los que se incluyen los linfomas y el cáncer de pulmón. Igualmente, las mutaciones que inactivan a los inhibidores de Cdk Ink4 que se unen a Cdk4 y Cdk6 se encuentran habitualmente en células cancerosas humanas.

La relación entre la ciclina D, el control del crecimiento celular, y el cáncer se ve reforzada por el hecho de que una proteína sustrato de los complejos Cdk4, 6/ciclina D aparece mutada en varios tumores humanos. Esta proteína, denominada **Rb**, se identificó como el producto de un gen responsable del retinoblastoma, un tipo de tumor de ojo infantil hereditario poco frecuente (véase Cap. 18). Estudios posteriores mostraron que las mutaciones que ocasionan la ausencia de la proteína Rb funcional, no sólo se encuentran en el retinoblastoma sino en diversos cánceres humanos más comunes. Rb es el prototipo de un **gen supresor de tumores** —un gen cuya inactivación conduce al desarrollo de un tumor—. Mientras que las proteínas oncogénicas como Ras (véase Cap. 15) y la ciclina D provocan la proliferación celular, las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores (incluyendo Rb y los inhibidores Dck Ink4) funcionan como frenos que ralentizan la progresión del ciclo celular.

Estudios subsiguientes han demostrado que Rb y miembros relacionados de la familia Rb juegan un papel clave en el acoplamiento de la maquinaria del ciclo celular a expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular y la síntesis de ADN (Fig. 16.17). La actividad de Rb se regula mediante cambios en su fosforilación a medida que las células avanzan por el ciclo. Concretamente, Rb es fosforilada por los complejos Cdk4, 6/ciclina D

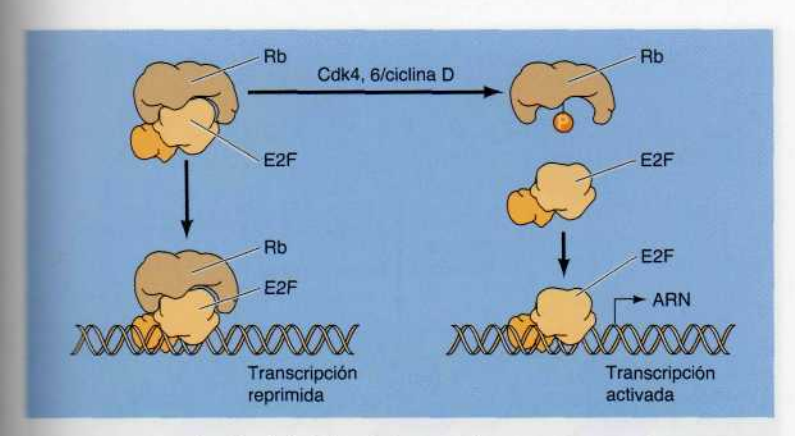


Figura 16.17 Regulación del ciclo celular por Rb y E2F. En su estado poco fosforilado, Rb se une a miembros de la familia E2F reprimiendo la transcripción de los genes regulados por E2F. La fosforilación de Rb por los complejos Cdk4, 6/ciclinaD provoca su disociación de E2F en la fase G_1 avanzada. Entonces E2F activa la expresión de sus genes diana, que codifican proteínas necesarias para la continuación del ciclo celular.

a medida que las células rebasan el punto de restricción en G_1. En su estado poco fosforilado (en G_0 o en G_1 temprana), Rb se une a los miembros de la familia de los factores de transcripción **E2F**, que regulan la expresión de varios genes relacionados con la progresión del ciclo celular, incluyendo al gen que codifica para la ciclina E. E2F se une a sus secuencias diana tanto en presencia como en ausencia de Rb. Sin embargo, Rb actúa como un represor, de tal manera que el complejo Rb/E2F impide que se transcriban los genes regulados por E2F. La fosforilación de Rb por los complejos Cdk4, 6/ciclina D provoca que el Rb fosforilado se disocie de E2F, lo que activa la transcripción de sus genes diana. Por tanto, *Rb interviene como un interruptor molecular que convierte a E2F de un represor a un activador de los genes requeridos para la progresión del ciclo celular.* Por su parte, el control de Rb a través de la fosforilación por Cdk4, 6/ciclina D acopla esta regulación de la expresión génica a la disponibilidad de factores de crecimiento en G_1.

La progresión a lo largo del punto de restricción y la entrada en la fase S está mediada por la activación de complejos de Cdk2/ciclina E (Fig. 16.18). Esto resulta en parte de la síntesis de ciclina E, que es estimulada por E2F después de la fosforilación de Rb. Adicionalmente, la actividad de Cdk2/ciclina E es inhibida en G_0 o temprano en G_1, mediante el inhibidor de Cdk, p27, que pertenece a la familia Cip/Kip (véase Tabla 16.1). Esta inhibición de Cdk2 por p27 es eliminada mediante múltiples mecanismos a medida que la célula progresa a través de G_1. En primer lugar, la señalización de factores de crecimiento mediante las vías Ras/Raf/MEK/ERK y PI 3-quinasa/Akt reduce la transcripción y traducción de p27, disminuyendo los niveles de p27 en el interior celular. Adicionalmente, la síntesis aumentada de ciclina D da lugar a la unión de p27 a complejos de Cdk4, 6/ciclina D, secuestrándolos e impidiendo su unión a Cdk2/ciclina E. Una vez que Cdk2 se activa, cataliza la degradación completa de p27 mediante su fosforilación y dirigiéndolo hacia su ubiquitinación. Esta autorregulación positiva entonces resulta en la activación completa de los complejos de Cdk2/ciclina E. La Cdk2 también fosforila a Rb, completando su inactivación. *Los complejos de Cdk2/ciclina E inician a continuación la fase S, mediante la activación de las proteínas MCM helicasa en los orígenes de replicación (véase Fig. 16.8), dando lugar a la iniciación de la síntesis de ADN.*

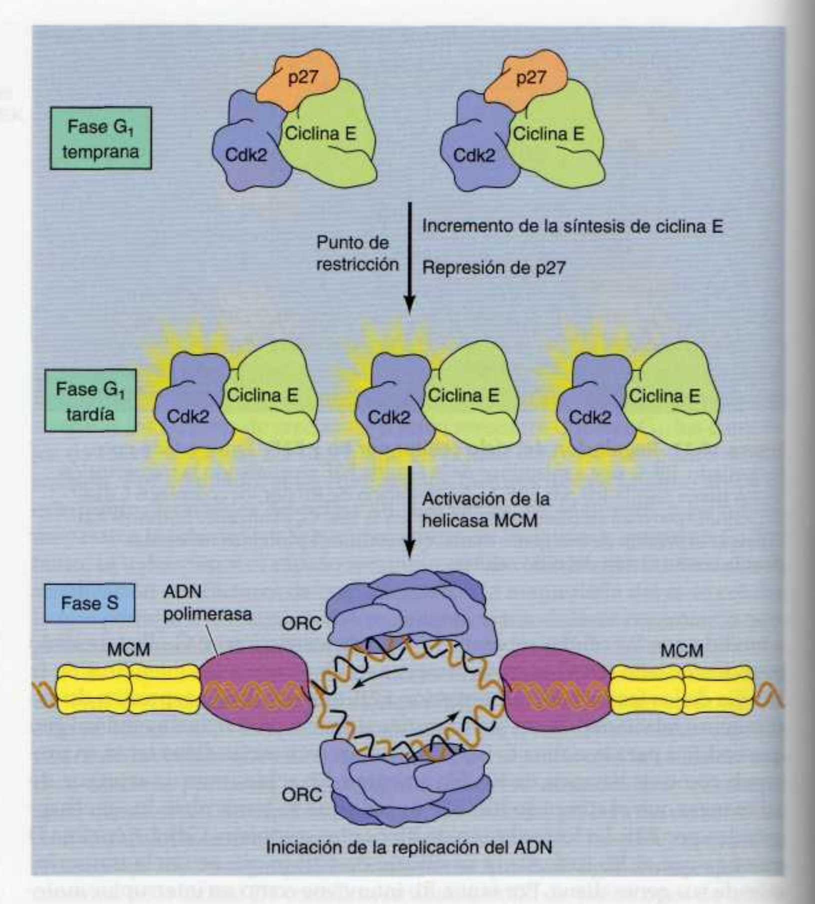


Figura 16.18 Cdk2/ciclina E y la entrada en fase S. En la fase G_1 temprana, los complejos Cdk2/ciclina E se encuentran inhibidos por el inhibidor de Cdk p27. El paso por el punto de restricción induce la síntesis de ciclina E vía activación de E2F. Adicionalmente, la señalización vía factor de crecimiento reduce los niveles de p27 inhibiendo la transcripción y la traducción. La activación resultante de Cdk2/ciclina E desencadena la activación de la helicasa MCM y la iniciación de la replicación del ADN.

Puntos de control de lesiones en el ADN

La proliferación celular es regulada no sólo mediante factores de crecimiento, sino también mediante una diversidad de señales que actúan para inhibir la progresión del ciclo celular. Los puntos de control de lesiones en el ADN juegan un papel crítico en el mantenimiento de la integridad del genoma, deteniendo la progresión del ciclo celular en respuesta al ADN dañado o incompletamente replicado. Estos puntos de control, que son operativos durante las fases G_1, S, y G_2 del ciclo celular, permiten el tiempo suficiente para que se repare el daño antes de que se reanude la replicación del ADN o la división celular (véase Fig. 16.7).

En la detención del ciclo celular intervienen dos proteína quinasas relacionadas, denominadas ATM y ATR, que se activan como consecuencia de daños al ADN. ATM y ATR activan una vía de señalización que no solamente induce la detención del ciclo celular, sino también la activación de los mecanismos de reparación del ADN y, en algunos casos, la muerte celular programada. El hecho de que la identificación inicial de estas proteínas se

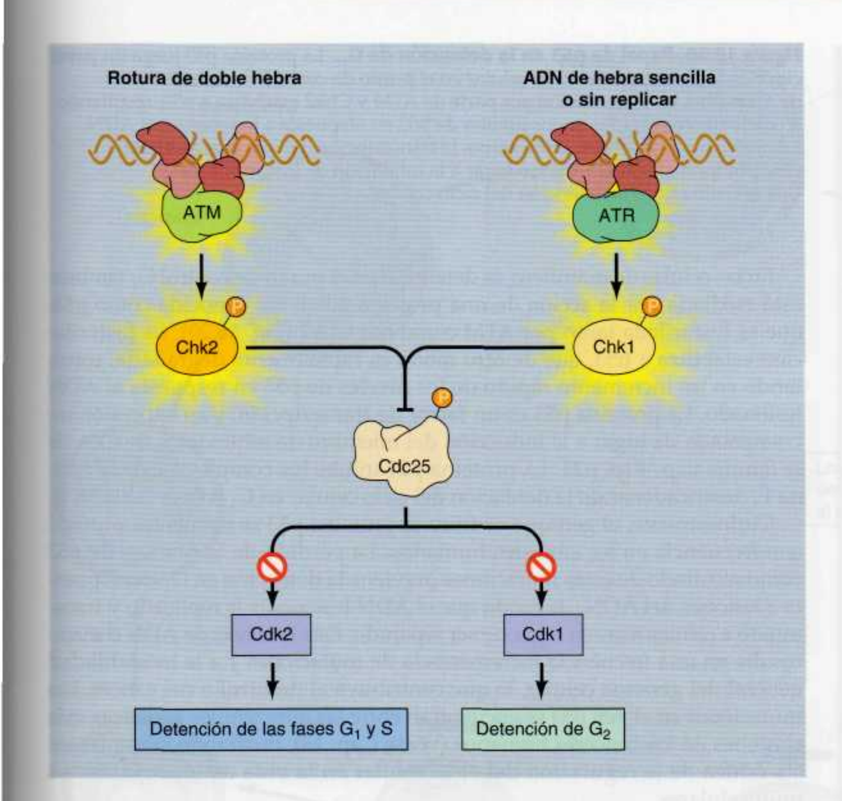


Figura 16.19 Detención del ciclo celular en los puntos de control de lesiones del ADN. Las proteínas quinasas ATM y ATR son activadas en complejos de proteínas que reconocen el ADN dañado. ATM es activada principalmente por las roturas de doble hebra y ATR por el ADN de hebra sencilla o sin replicar. A continuación, ATR y ATM fosforilan y activan a las proteína quinasas Chk2 y Chk1, respectivamente. Chk1 y Chk2 fosforilan e inhiben a las proteína fosfatasa Cdc25, que son necesarias para activar a Cdk1 y Cdk2, de modo que su inhibición da lugar a la detención en los puntos de control de lesiones al ADN en G_1, S y G_2.

debiera a la relación etiológica existente entre las mutaciones del gen que codifica ATM y la enfermedad ataxia telangiectasia, que da lugar a anomalías de los sistema nervioso e inmunitario, además de una elevada prevalencia de tumores en los sujetos afectados, pone de relieve la importancia que reviste esta respuesta a las lesiones en el ADN.

Tanto ATM como ATR forman parte de complejos proteicos que reconocen ADN dañado o sin replicar (Fig. 16.19). ATM se activa fundamentalmente por roturas de la doble hebra, mientras que ATR lo hace por roturas de la hebra sencilla o secuencias de ADN sin replicar. Tras su activación por una lesión en el ADN, ATM y ATR fosforilan y activan a las **quinasas de los puntos de control** Chk2 y Chk1, respectivamente. Chk1 y Chk2 inducen la detención del ciclo celular a través de la fosforilación y la inhibición o la inducción de la degradación de las fosfatasas Cdc25, que son necesarias para activar a Cdk1 y Cdk2 a través de la eliminación de los residuos fosforilados inhibitorios (véase Fig. 16.15) durante la progresión del ciclo celular. De este modo, las lesiones del ADN dan lugar a la inhibición de Cdk2, que induce la parada del ciclo celular en G_1 y S, y Cdk1, que provoca la detención del ciclo en G_2.

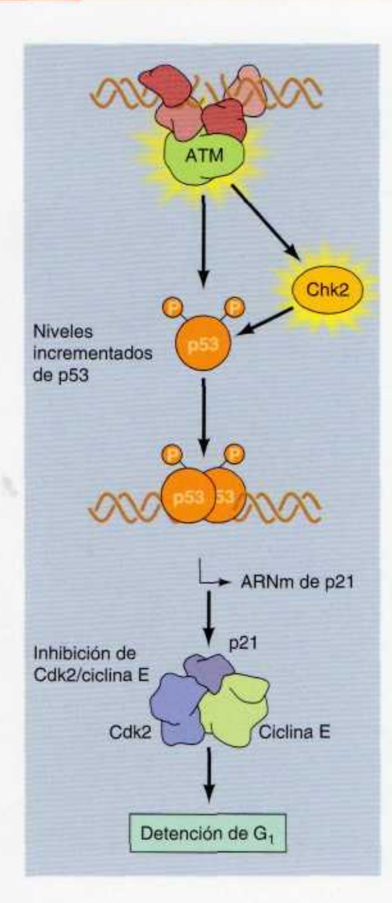


Figura 16.20 Papel de p53 en la detención de G_1. La proteína p53 juega un papel clave en la detención del ciclo celular en el punto de control G_1 en las células de mamífero. La fosforilación por parte de ATM y Chk2 estabiliza a p53, resultando en incrementos rápidos en los niveles de p53 en respuesta a lesiones en el ADN. La proteína p53 a continuación activa la transcripción del gen que codifica el inhibidor de Cdk p21, dando lugar a la inhibición de los complejos Cdk2/ciclina E y a la detención del ciclo celular.

En las células de mamífero, la detención en el punto de control G_1 también está mediada por la acción de una proteína adicional conocida como **p53**, que es fosforilada tanto por ATM como por Chk2 (Fig. 16.20). La fosforilación estabiliza a p53, que de otro modo es rápidamente degradada, resultando en un incremento rápido de los niveles de p53 en respuesta al ADN lesionado. La proteína p53 es un factor de transcripción, y su expresión incrementada da lugar a la inducción del miembro de inhibidores de Cdk de la familia Cip/Kip, p21. La proteína p21 inhibe los complejos Cdk2/ciclina E, desencadenando la detención del ciclo celular en G_1 (véase Tabla 16.1).

Curiosamente, el gen que codifica la proteína p53 se encuentra mutado con frecuencia en los cánceres humanos. La pérdida de la función de p53 como resultado de estas mutaciones previene la detención en G_1 en respuesta a lesiones del ADN, de modo que el ADN lesionado es replicado y transmitido a células hijas en lugar de ser reparado. Esta herencia de ADN dañado resulta en una frecuencia incrementada de mutaciones y a la inestabilidad general del genoma celular, lo que contribuye al desarrollo del cáncer. Las mutaciones en el gen *p53* se encuentran entre las alteraciones genéticas más comunes en los cánceres humanos (véase Cap. 18), ilustrando la importancia crítica de la regulación del ciclo celular en la vida de los organismos multicelulares.

Acontecimientos de la fase M

La fase M es el período más llamativo del ciclo celular, en el que se produce la reorganización de casi todos los componentes de la célula. Durante la mitosis (división nuclear) los cromosomas se condensan, la envuelta nuclear de la mayoría de las células se desintegra, el citoesqueleto se reorganiza para formar el huso mitótico, y los cromosomas migran a polos opuestos. Tras la segregación de los cromosomas se suele producir la división de la célula (citocinesis). Aunque muchos de estos acontecimientos ya han sido descritos en capítulos anteriores, se revisan aquí en el contexto de una visión coordinada de la fase M y la acción de MPF (Cdk1/ciclina B).

Etapas de la mitosis

Aunque muchos de los detalles de la mitosis varían entre los diferentes organismos, los procesos básicos que aseguran la segregación fidedigna de las cromátidas hermanas se conservan en todos los eucariotas. Entre estos procesos básicos de la mitosis se incluyen la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico, y la unión de los cromosomas a los microtúbulos del huso. Una vez llegado este punto, las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso, tras lo que se forman los núcleos hijos.

Tradicionalmente, la mitosis se divide en cuatro etapas —**profase**, **metafase**, **anafase**, y **telofase**— que, en el caso de la célula animal, se ilustran en las Figuras 16.21 y 16.22. El comienzo de la profase queda determinado por la aparición de los cromosomas condensados, cada uno de los cuales está constituido por dos cromátidas hermanas (las moléculas de ADN hijas que se produjeron en la fase S). Estas moléculas de ADN replicado permanecen

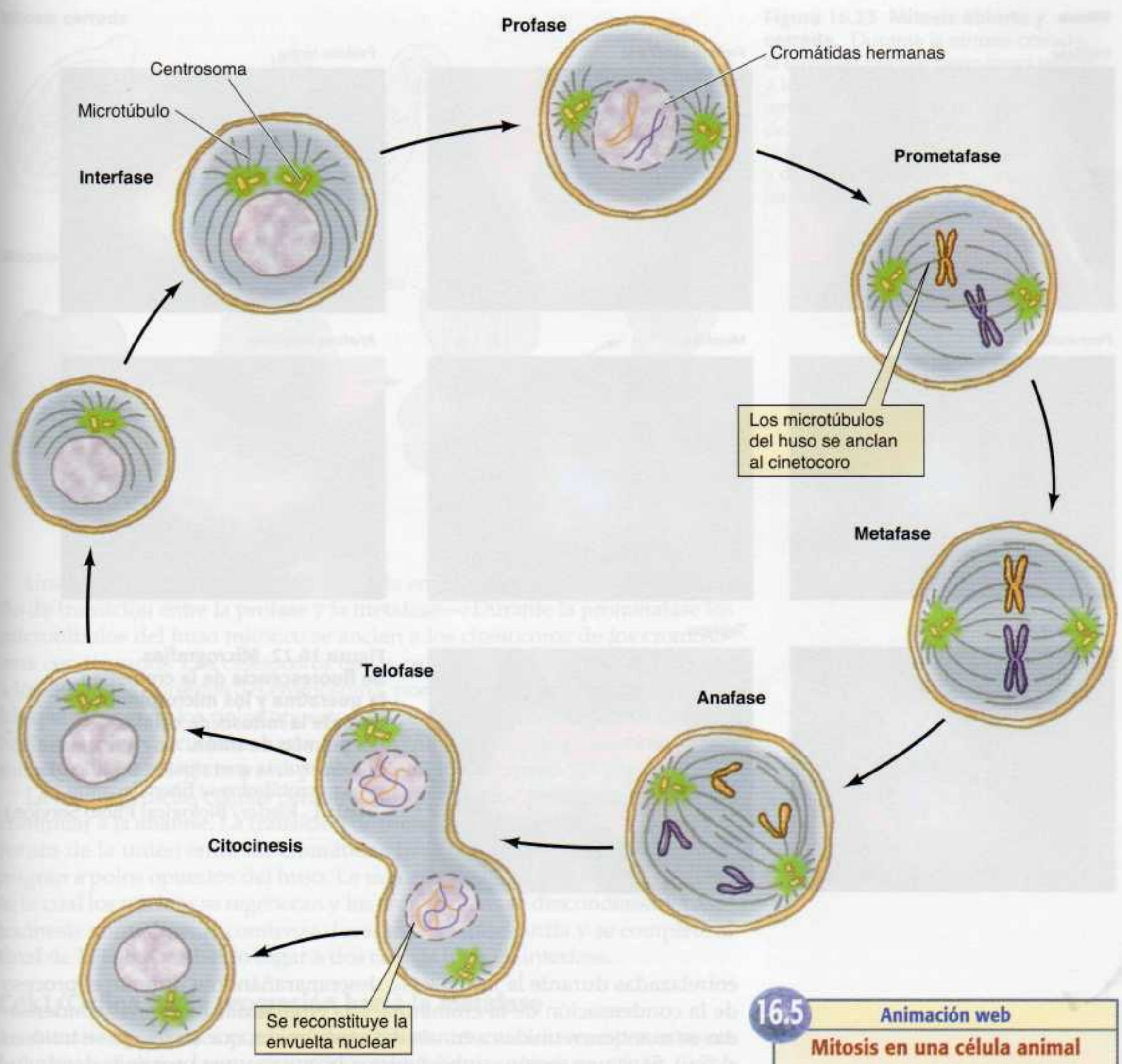


Figura 16.21 Etapas de la mitosis en la célula animal. Durante la profase, los cromosomas se condensan y los centrosomas se desplazan a lados opuestos del núcleo, comenzando la formación del huso mitótico. La ruptura de la envuelta nuclear permite a los microtúbulos del huso anclarse a los cinetocoros de los cromosomas. Durante la prometafase los cromosomas se agitan hacia delante y hacia atrás entre los centrosomas y el centro de la célula, para finalmente quedar alineados en la zona media del huso (metafase). En la anafase, las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso. La mitosis termina con la reconstitución de las envolturas nucleares y con la descondensación de los cromosomas en la telofase, y la citocinesis da lugar a dos células hijas interfásicas. Conviene destacar que cada célula hija recibe un centrosoma que se duplicará previamente a la siguiente mitosis.

16.5 **Animación web**

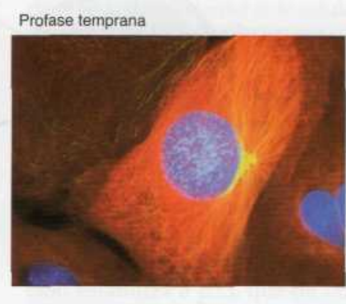
Mitosis en una célula animal

La mitosis, que es la división del núcleo, consiste en cuatro fases –profase, metafase, anafase y telofase– y está seguida de la división del citoplasma, denominada citocinesis.

Mitosis

Interfase

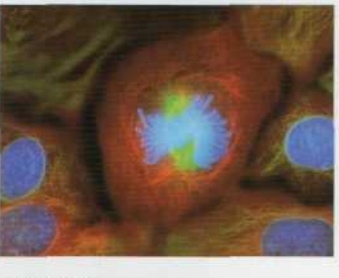
Profase temprana



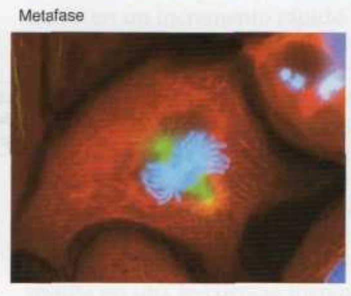
Profase tardía



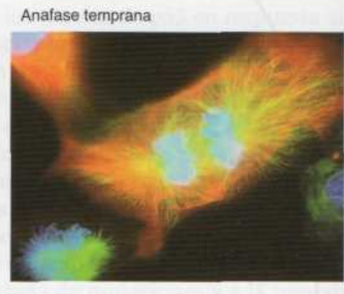
Prometafase



Metafase



Anafase temprana



Anafase tardía



Telofase



Figura 16.22 Micrografías de fluorescencia de la cromatina, la queratina y los microtúbulos durante la mitosis de células del pulmón de tritón. La cromatina se tiñe de azul, la queratina se tiñe de rojo, y los microtúbulos se tiñen de verde. (Conly L. Rieder/Biological Photo Service.)

entrelazadas durante la fase S y G_2, desenmarañándose durante el proceso de la condensación de la cromatina. Las cromátidas hermanas condensadas se mantienen unidas a través del **centrómero**, que (como ya se trató en el Cap. 5) es una región cromosómica a la que se unen proteínas dando lugar al **cinetocoro** —el lugar de anclaje de los microtúbulos del huso—. Además de la condensación de los cromosomas, durante la profase se producen cambios en el citoplasma que conducen al desarrollo del huso mitótico. Los **centrosomas** (que se duplicaron en la interfase) se separan y migran a lados opuestos del núcleo. Ahí actúan como los dos polos del **huso mitótico**, que comienza a formarse durante la profase tardía.

En los eucariotas superiores el final de la profase se corresponde con la rotura de la envuelta nuclear. Sin embargo, este desensamblaje del núcleo no es una característica universal de la mitosis y no ocurre en todas las células. Algunos eucariotas unicelulares (por ejemplo, levaduras) sufren la denominada mitosis cerrada en la que la envuelta nuclear permanece intacta (Fig. 16.23). En la mitosis cerrada los cromosomas descendientes migran a polos opuestos del núcleo, que a continuación se divide en dos. En estas células, los cuerpos polares del huso están incluidos en la envuelta nuclear, y el núcleo se divide en dos tras la migración de los cromosomas hijos a los polos opuestos del huso.

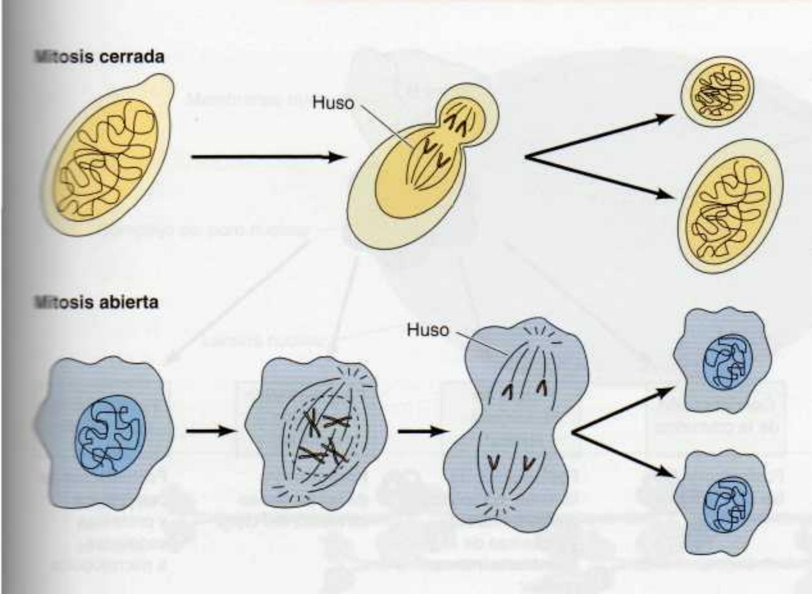


Figura 16.23 Mitosis abierta y cerrada. Durante la mitosis cerrada, la envuelta nuclear permanece intacta y los cromosomas migran a polos opuestos de un huso en el interior del núcleo. Durante la mitosis abierta, la envuelta nuclear se degrada y después se reforma en torno a dos juegos de cromosomas separados.

Una vez terminada la profase, la célula entra en **prometafase** —un período de transición entre la profase y la metafase—. Durante la prometafase los microtúbulos del huso mitótico se anclan a los cinetocoros de los cromosomas condensados. Los cinetocoros de las cromátidas hermanas se disponen a los dos lados opuestos del cromosoma, por lo que se unen a los microtúbulos que surgen de los polos opuestos del huso. Los cromosomas se mueven hacia delante y hacia atrás hasta que se alinean en la placa metafásica en la mitad del huso. Llegado a este punto la célula ha alcanzado la metafase.

La mayoría de las células permanecen en metafase poco tiempo antes de continuar a la anafase. La transición de metafase a anafase se produce por la rotura de la unión entre las cromátidas hermanas, las cuales se separan y migran a polos opuestos del huso. La mitosis finaliza con la telofase, durante la cual los núcleos se regeneran y los cromosomas se descondensan. La citocinesis normalmente comienza durante la anafase tardía y se completa al final de la telofase, dando lugar a dos células hijas en interfase.

Cdk1/Ciclina B y la progresión hacia la metafase

La mitosis supone unos cambios muy importantes en varios componentes celulares, que llevan a la reorganización casi total de la estructura celular. Como ya se trató anteriormente en este capítulo, estos procesos iniciados mediante la activación de la proteína quinasa Cdk1/ciclina B (MPF). Cdk1/ciclina B actúan como reguladores principales de la transición a la fase M tanto a través de la activación de otras proteína quinasas mitóticas como por fosforilación directa de algunas de las proteínas estructurales que participan en esta reorganización celular (Fig. 16.24).

La condensación de la cromatina interfásica para dar lugar a los cromosomas compactos de las células mitóticas es un suceso clave en la mitosis, ya que permite que los cromosomas se desplacen por el huso mitótico sin romperse y sin enredarse. Como ya se trató en el Capítulo 5, la cromatina en los núcleos interfásicos se condensa aproximadamente por un factor de mil para formar los cromosomas metafásicos. Esta cromatina tan condensada no puede transcribirse, por lo que la transcripción cesa al producirse la condensación de la cromatina. A pesar de la gran importancia de este hecho, todavía no se comprende por completo ni la estructura de los cromosomas metafásicos ni los mecanismos moleculares de la condensación de la croma-

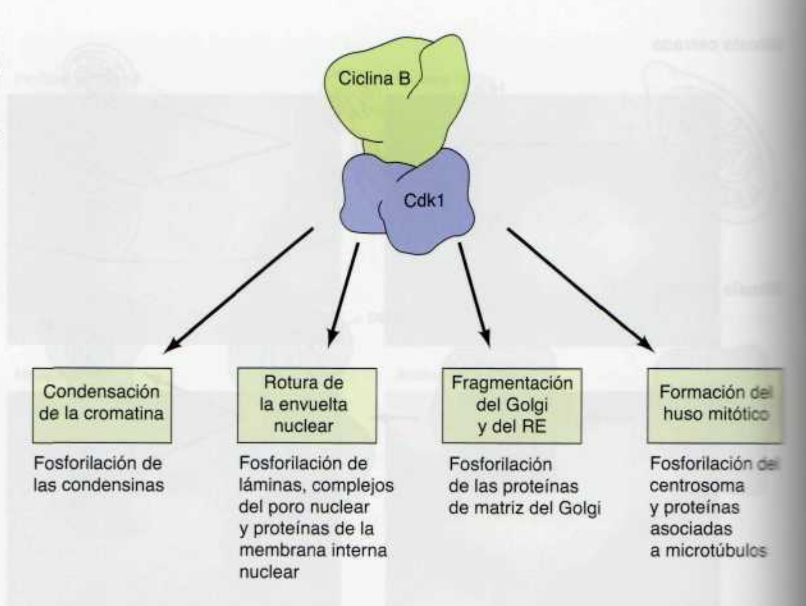


Figura 16.24 Dianas del Cdk1/ciclina B. El Cdk1/ciclina B induce varios cambios en el núcleo y en el citoplasma durante la puesta en marcha de la fase M; tanto mediante la activación de otras proteínas quinasas y mediante la fosforilación de proteínas como condensinas, componentes de la envuelta nuclear, proteínas de matriz del Golgi, y proteínas asociadas con centrosomas y microtúbulos.

tina. Sin embargo, recientemente se han descrito unos complejos proteicos denominados **condensinas**, que son miembros de una clase de proteínas de «mantenimiento estructural de la cromatina» (SMC: *structural maintenance of chromatin*) que juegan papeles clave en la organización de los cromosomas eucariotas.

Las condensinas y otra familia de proteínas SMC, denominadas **cohesinas**, contribuyen a la segregación cromosómica durante la mitosis (Fig. 16.25). Las cohesinas se unen al ADN en fase S y mantienen la unión entre las cromátidas hermanas después de la replicación del ADN. Cuando la célula entra en la fase M, las condensinas son activadas mediante fosforilación de Cdk1/ciclina B. Las condensinas a continuación reemplazan a las cohesinas a lo largo de la mayor parte del cromosoma, de forma que las cromátidas hermanas permanecen unidas sólo por el centrómero. Las condensinas también inducen la condensación cromatínica, desencadenando la formación de cromosomas metafásicos.

La degradación de la envuelta nuclear, que es uno de los eventos más dramáticos de la mitosis, implica modificaciones en todos sus componentes: las membranas nucleares se fragmentan, los complejos de poro nuclear

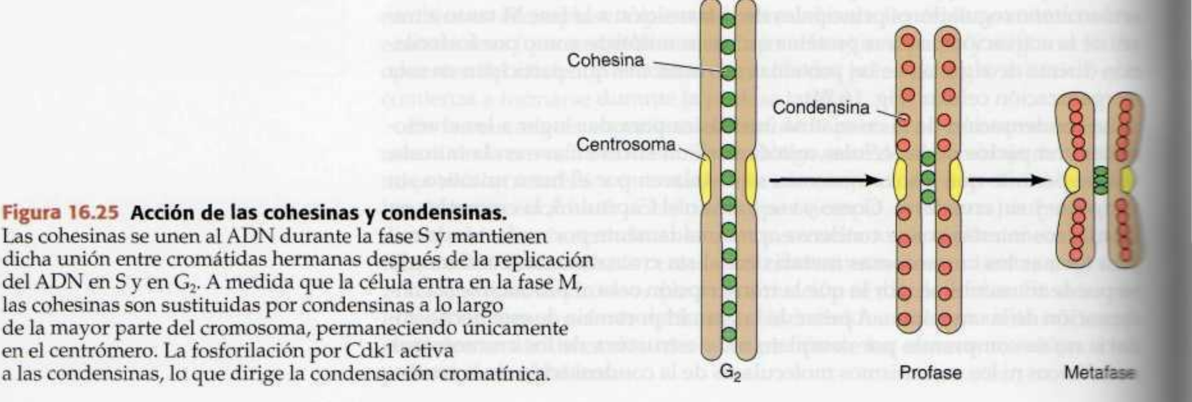
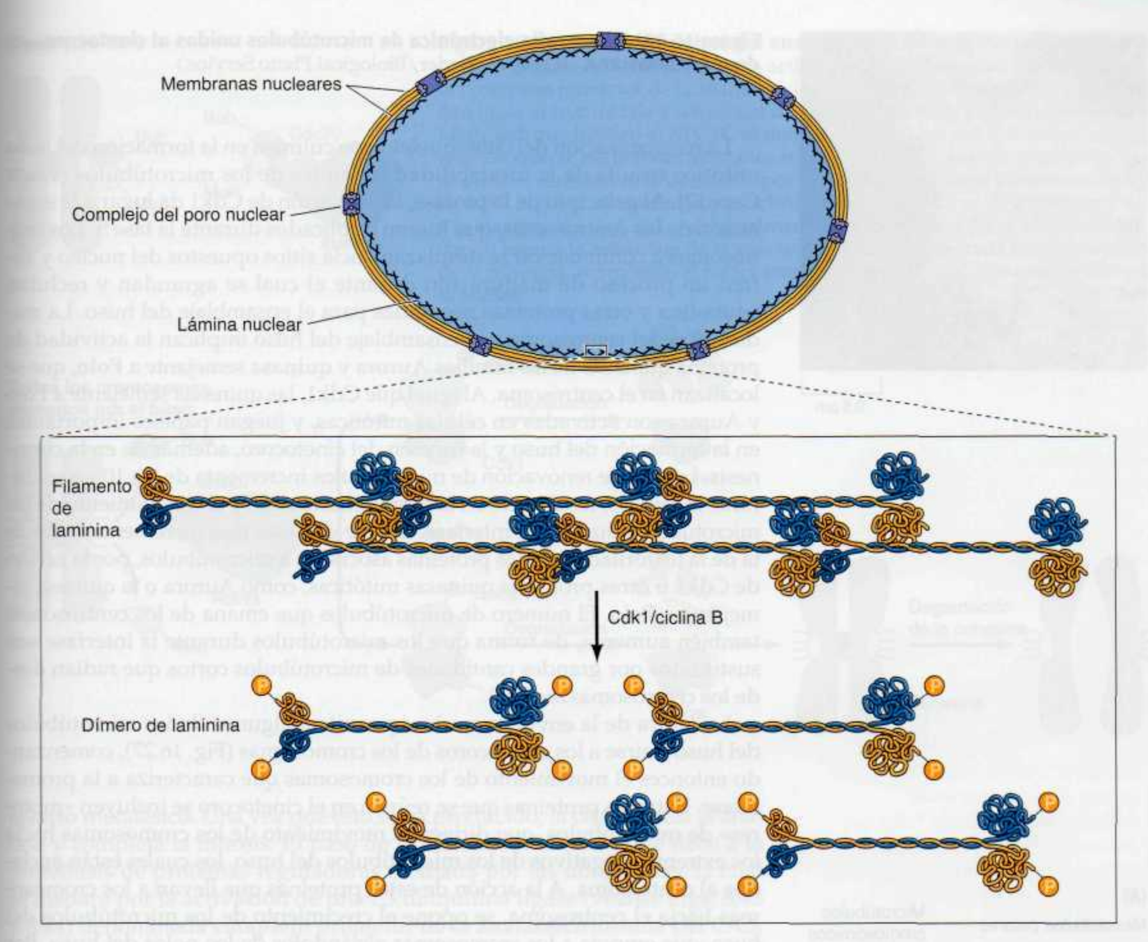


Figura 16.25 Acción de las cohesinas y condensinas. Las cohesinas se unen al ADN durante la fase S y mantienen dicha unión entre cromátidas hermanas después de la replicación del ADN en S y en G_2. A medida que la célula entra en la fase M, las cohesinas son sustituidas por condensinas a lo largo de la mayor parte del cromosoma, permaneciendo únicamente en el centrómero. La fosforilación por Cdk1 activa a las condensinas, lo que dirige la condensación cromatínica.



se disocian, y la lámina nuclear se despolimeriza. La despolimerización de la lámina nuclear (la red de filamentos que subyacen a la membrana nuclear) resulta de la fosforilación de las lamininas por Cdk1 (Fig. 16.26). La fosforilación causa la rotura de los filamentos de laminina en dímenos individuales de laminina, desencadenando directamente la despolimerización de la lámina nuclear. Cdk1 también fosforila a diversas proteínas en la membrana nuclear interna y en el complejo del poro nuclear, desencadenando el desensamblaje de los complejos de poro nuclear y la separación de la membrana nuclear interna de las lamininas y la cromatina. En las células animales, las proteínas integrales de la membrana nuclear son absorbidas a continuación en el retículo endoplásmico, que permanece como una red intacta y se distribuye a las células hijas durante la mitosis.

Figura 16.26 Degradación de la envuelta nuclear. Cdk1/ciclina B fosforila las lamininas nucleares además de proteínas del complejo del poro nuclear y de la membrana nuclear interna. La fosforilación de las lamininas causa que los filamentos que forman la lámina nuclear se disocien en dímeros libres de laminina.

El aparato de Golgi se fragmenta en pequeñas vesículas en la mitosis, que pueden ser absorbidas por el retículo endoplásmico o distribuidas directamente a las células hijas durante la citocinesis. La degradación del aparato de Golgi depende de la fosforilación de diversas proteínas de la matriz del Golgi por Cdk1 y otras proteína quinasas activadas durante la mitosis. Algunas de estas proteínas de la matriz del Golgi (como GM130 y GRASP-65) son necesarias para el acoplamiento de las vesículas recubiertas de COPI a la membrana del aparato de Golgi; su fosforilación por acción de Cdk1 inhibe el acoplamiento y la fusión de las vesículas, lo que provoca la fragmentación de dicho aparato.

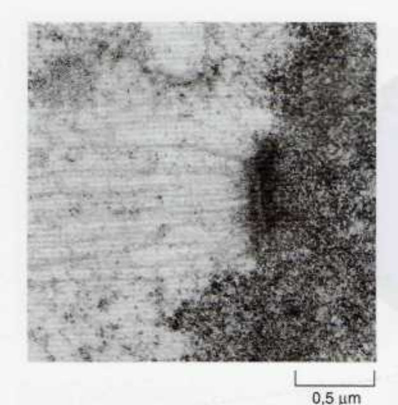


Figura 16.27 Micrografía electrónica de microtúbulos unidos al cinetocoro de un cromosoma. (Conly L. Rieder/Biological Photo Service.)

La reorganización del citoesqueleto que culmina en la formación del huso mitótico resulta de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos (véase Cap. 12). Al principio de la profase, la activación de Cdk1 da lugar a la separación de los centrosomas, que fueron duplicados durante la fase S. Los centrosomas a continuación se desplazan hacia sitios opuestos del núcleo y sufren un proceso de maduración durante el cual se agrandan y reclutan γ-tubulina y otras proteínas necesarias para el ensamblaje del huso. La maduración del centrosoma y el ensamblaje del huso implican la actividad de proteína quinasas de las familias **Aurora y quinasa** semejante a **Polo**, que se localizan en el centrosoma. Al igual que Cdk1, las quinasas semejante a Polo y Aurora son activadas en células mitóticas, y juegan papeles importantes en la formación del huso y la función del cinetocoro, además de en la citocinesis. La tasa de renovación de microtúbulos incrementa de 5 a 10 veces durante la mitosis, resultando en la despolimerización y el encogimiento de los microtúbulos durante la interfase. Se cree que esta tasa incrementada resulta de la fosforilación de las proteínas asociadas a microtúbulos, por la acción de Cdk1 u otras proteínas quinasas mitóticas, como Aurora o la quinasa semejante a Polo. El número de microtúbulos que emana de los centrosomas también aumenta, de forma que los microtúbulos durante la interfase son sustituidos por grandes cantidades de microtúbulos cortos que radian desde los centrosomas.

La rotura de la envuelta nuclear permite a algunos de los microtúbulos del huso unirse a los cinetocoros de los cromosomas (Fig. 16.27), comenzando entonces el movimiento de los cromosomas que caracteriza a la prometafase. Entre las proteínas que se reúnen en el cinetocoro se incluyen «motores» de microtúbulos, que dirigen el movimiento de los cromosomas hacia los extremos negativos de los microtúbulos del huso, los cuales están anclados al centrosoma. A la acción de estas proteínas que llevan a los cromosomas hacia el centrosoma, se opone el crecimiento de los microtúbulos del huso, que empuja a los cromosomas alejándolos de los polos del huso. Por tanto, los cromosomas en la prometafase se agitan hacia delante y hacia atrás entre los centrosomas y la zona media del huso.

Los microtúbulos de los polos opuestos del huso se acaban uniendo a los dos cinetocoros de las cromátidas hermanas (que se localizan en lados opuestos del cromosoma), y el equilibrio de fuerzas que actúa sobre los cromosomas hace que éstos queden alineados en la placa metafásica en la mitad del huso (Fig. 16.28). Como se analizó en el Capítulo 12, el huso consiste en microtúbulos cinetocóricos y cromosómicos, que se encuentran unidos a los cromosomas, además de microtúbulos polares, que solapan entre sí en el centro de la célula. Adicionalmente, los microtúbulos astrales cortos radian hacia el exterior desde los centrosomas hacia la periferia celular.

Punto de control de ensamblaje del huso y progresión hacia anafase

Como ya se mencionó anteriormente en este capítulo, el **punto de control de ensamblaje** del huso monitoriza el alineamiento de los cromosomas en

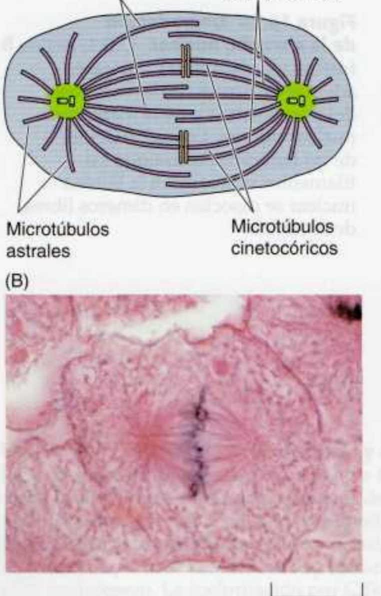


Figura 16.28 Huso metafásico. (A) El huso está constituido por tres tipos de microtúbulos. Los microtúbulos cinetocóricos se anclan a los cromosomas, los microtúbulos polares se superponen entre sí en el centro de la célula, y los microtúbulos astrales irradian desde el centrosoma hacia la periferia celular. (B) Célula en metafase del pez corégono. (B, Michael Abbey/Photo Researchers, Inc.)

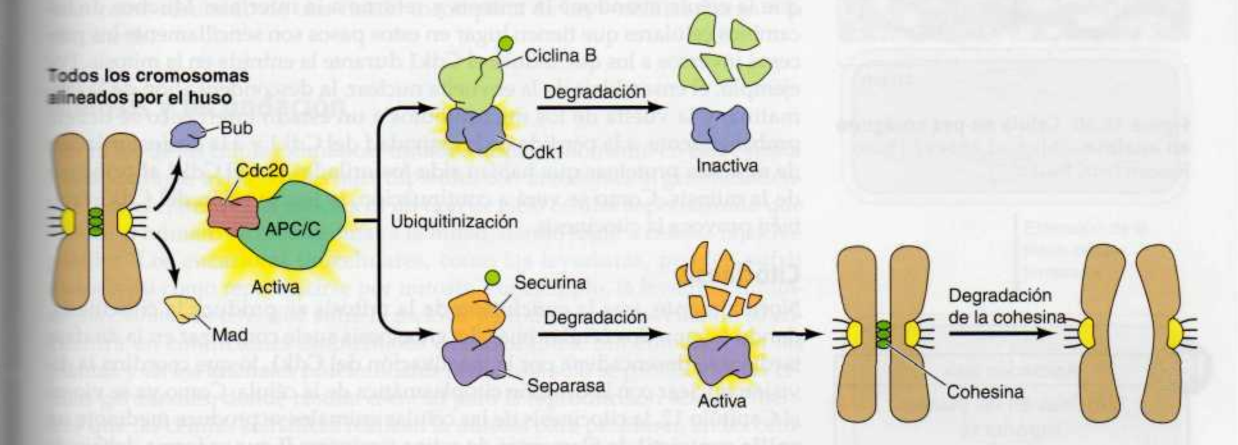


Figura 16.29 Punto de control del ensamblaje del huso. La progresión hacia la anafase está mediada por la activación de la ubiquitina ligasa del complejo promotor de la anafase ciclosoma (APC/C). Los cinetocoros libres dan lugar al ensamblaje y activación de un complejo formado por proteínas Mad/Bub que inhiben al APC/C al unirse a Cdc20. Una vez que todos los cromosomas se encuentran alineados sobre el huso, el complejo Mad/Bub se disocia, eliminando la inhibición por Cdc20 y dando lugar a la activación de APC. APC/C ubiquitiniza a la ciclina B, dando lugar a su degradación y a la inactivación de Cdk1. Adicionalmente, APC/C ubiquitiniza a la securina, dando lugar a la activación de la separasa. La separasa degrada una subunidad de la cohesina, rompiendo el enlace entre cromátidas hermanas e iniciando la anafase.

el huso metafásico. Una vez que esto se ha producido, la célula inicia la anafase y completa la mitosis. El paso de la metafase a la anafase se debe a la proteólisis de proteínas reguladoras mediada por las ubiquitinas, la cual se dispara por la activación de una E3 ubiquitina ligasa (véanse Figs. 8.43 y 8.44) denominada **complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C)**. La activación del APC/C del complejo promotor de la anafase se induce al comienzo de la mitosis, por lo que la activación de Cdk1/ciclina B, en última instancia, provoca su propia destrucción. El APC/C sin embargo, permanece inactivo hasta que la célula rebasa el punto de control de la metafase, después del cual la activación del sistema de degradación constituido por las ubiquitinas permite el paso de la metafase a la anafase y la progresión a través del resto de la mitosis.

El punto de control de ensamblaje del huso es notable en que la presencia de un solo cromosoma no alineado es suficiente para impedir la activación del APC/C. El punto de control está mediado por un complejo de proteínas, denominadas proteínas Mad/Bub, que se unen a Cdc20 —un componente necesario para el APC/C (Fig. 16.29)—. Las proteínas Mad/Bub se ensamblan en un complejo activo en cinetócoros libres. Una vez que los microtúbulos se han unido a los cinetócoros, el complejo Mad/Bub se desensambla y cesa la inhibición de Cdc20, dando lugar a la activación del APC/C.

La activación del APC/C resulta en la ubiquitinación y degradación de dos proteínas diana clave. El comienzo de la anafase resulta de la degradación proteolítica de un componente de las cohesinas, que mantiene la conexión entre cromátidas hermanas mientras que están alineadas en la placa metafásica (véase Fig. 16.25). La degradación de las cohesinas no está catalizada directamente por el APC/C, que sin embargo degrada a una proteína denominada securina que es una subunidad reguladora de una proteasa

■ **Las anomalías en la segregación cromosómica resultantes de fallos del punto de control de ensamblaje del huso son comunes en las células cancerosas y se cree que juegan un papel importante en el desarrollo de múltiples tumores.**

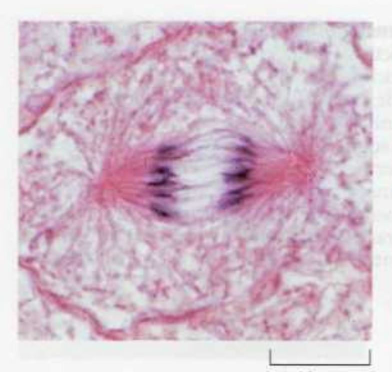


Figura 16.30 Célula de pez corégono en anafase. (Michael Abbey/ Photo Researchers, Inc.)

denominada separasa. La degradación de la securina resulta en la activación de la separasa, que a su vez degrada la cohesina. La escisión de la cohesina rompe la unión entre cromátidas hermanas, permitiendo que su segregación moviéndose hacia polos opuestos del huso (Fig. 16.30). La separación de los cromosomas durante la anafase procede a continuación, como resultado de la acción de diversos tipos de proteínas motoras asociadas con los microtúbulos del huso (véanse Figs. 12.59 y 12.60).

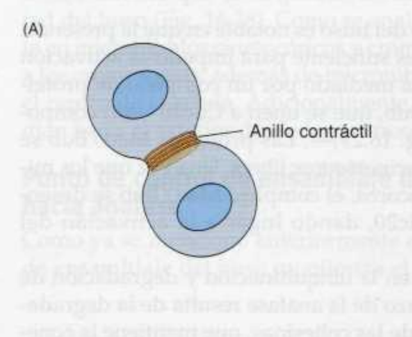
La otra proteína reguladora clave que es una diana para la acción de las ubiquitinas y para la degradación por el APC/C, es la ciclina B. La degradación de la ciclina B provoca la inactivación del Cdk1, lo que se requiere para que la célula abandone la mitosis y retorne a la interfase. Muchos de los cambios celulares que tienen lugar en estos pasos son sencillamente los procesos inversos a los que induce el Cdk1 durante la entrada en la mitosis. Por ejemplo, el ensamblaje de la envuelta nuclear, la descondensación de la cromatina, y la vuelta de los microtúbulos a un estado interfásico se deben, probablemente, a la pérdida de la actividad del Cdk1 y a la desfosforilación de aquellas proteínas que habían sido fosforiladas por el Cdk1 al principio de la mitosis. Como se verá a continuación, la inactivación del Cdk1 también provoca la citocinesis.

Citocinesis

Normalmente, tras la conclusión de la mitosis se produce la citocinesis, dando lugar a dos células hijas. La citocinesis suele comenzar en la anafase tardía y se desencadena por la inactivación del Cdk1, lo que coordina la división nuclear con la división citoplasmática de la célula. Como ya se vio en el Capítulo 12, la citocinesis de las células animales se produce mediante un **anillo contráctil** de filamentos de actina y miosina II que se forma debajo de la membrana plasmática (Fig. 16.31). La localización de este anillo queda determinada por la posición del huso mitótico, por lo que la célula se divide por un plano que pasa a través de la placa metafásica, perpendicular al huso. A medida que los filamentos de actina y miosina se contraen, estos tiran de la membrana plasmática, lo que hace que la célula se estrangule y quede dividida en dos. A continuación, se rompe el puente entre las dos células hijas, y la membrana plasmática se vuelve a sellar.

El mecanismo de la citocinesis es diferente en las células de las plantas superiores. En vez de ser estranguladas y divididas en dos por el anillo contráctil, estas células se dividen mediante la formación de nuevas paredes celulares y de nuevas membranas plasmáticas dentro de la célula (Fig. 16.32).

> **16.6 Animación web**
>
> **Citocinas en las plantas superiores**
>
> Durante la división celular, una célula vegetal divide su citoplasma depositando vesículas del Golgi que contienen precursores de la pared celular en el punto previo de la placa metafásica, construyendo una estructura mayor y con forma discoidal que crece hacia el exterior y se fusiona con la membrana plasmática.



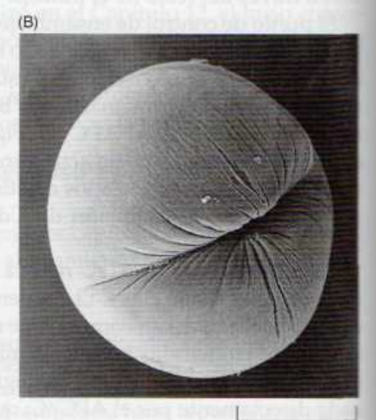


Figura 16.31 Citocinesis de las células animales. (A) La citocinesis se produce por la contracción de un anillo de filamentos de actina y miosina que estrangula a la célula dividiéndola en dos. (B) Micrografía electrónica de barrido de un huevo de rana que está sufriendo la citocinesis. (B, David M. Phillips/ Visuals Unlimited.)

En la telofase temprana, vesículas del aparato de Golgi que portan precursores de la pared celular se unen a los microtúbulos del huso y se acumulan en el lugar de la placa metafásica. Entonces estas vesículas se fusionan formando una estructura grande, en estructura discoide y envuelta por membrana, y su contenido en polisacáridos se ensamblan para formar la matriz de una nueva pared celular (denominada **placa celular**). La placa celular se extiende hacia fuera, perpendicular al huso, hasta que alcanza la membrana plasmática. La membrana que rodea la placa celular a continuación se fusiona con la membrana plasmática parental, dividiendo a la célula en dos. Las conexiones entre células hijas (plasmodesmas, véase Fig. 14.30) se forman como resultado de una fusión incompleta de las vesículas durante la citocinesis.

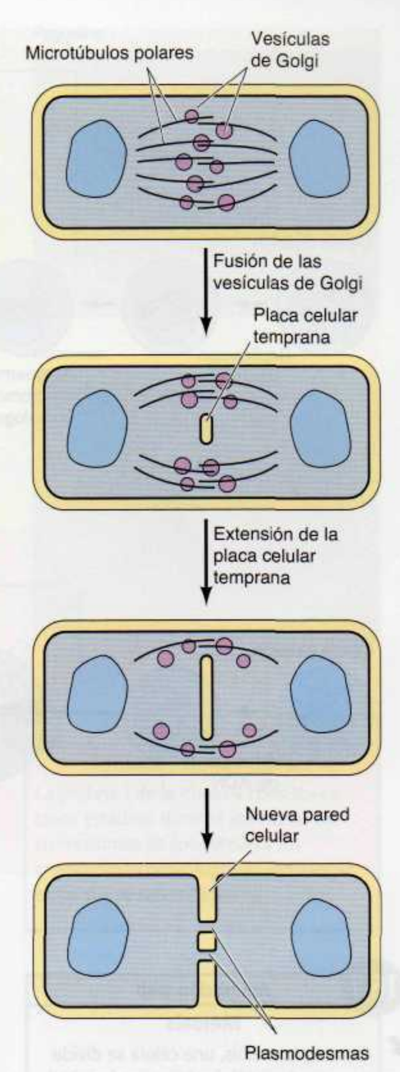


Figura 16.32 Citocinesis en las plantas superiores. Las vesículas del Golgi que contienen precursores de la pared celular se unen a los microtúbulos polares, en el lugar donde se encontraba la placa metafásica. La fusión de estas vesículas da lugar a una estructura discoide, rodeada de membrana (la placa celular temprana) que crece hacia afuera y que se funde con la membrana plasmática parental. Las células hijas permanecen conectadas en los plasmodesmas.

Meiosis y fecundación

Los ciclos de las células somáticas tratados hasta el momento en este capítulo, daban lugar a dos células hijas diploides con una dotación genética idéntica. Por el contrario, la meiosis es un tipo de ciclo celular especializado que reduce el número de cromosomas a la mitad, dando lugar a células hijas haploides. Los eucariotas unicelulares, como las levaduras, pueden sufrir meiosis así como reproducirse por mitosis. Por ejemplo, la levadura diploide *Saccharomyces cerevisiae* sufre la meiosis y produce esporas cuando se encuentra en condiciones ambientales desfavorables. Sin embargo, en las plantas y en los animales pluricelulares la meiosis sólo se produce en las células germinales, donde resulta esencial para la reproducción sexual. Mientras que las células somáticas realizan la mitosis para proliferar, en las células germinales tiene lugar la meiosis para producir gametos haploides (el espermatozoide y el óvulo). El desarrollo de un nuevo organismo comienza con la fusión de estos gametos en la fecundación.

Proceso de la meiosis

A diferencia de la mitosis, la **meiosis** supone la división de una célula parental diploide en una progenie haploide, de tal manera que cada célula contiene sólo un miembro del par de cromosomas homólogos presentes en el progenitor diploide (Fig. 16.33). Esta reducción en el número de cromosomas se realiza mediante dos rondas consecutivas de división nuclear y celular (denominadas meiosis I y meiosis II), que ocurren tras una única ronda de replicación del ADN. Al igual que la mitosis, la meiosis I comienza después de que finalice la fase S y de que los cromosomas parentales se hayan replicado para producir cromátidas hermanas idénticas. Sin embargo, el patrón de la segregación de los cromosomas en la meiosis I es muy diferente al de la mitosis. Durante la meiosis I, los cromosomas homólogos primero se emparejan unos con otros y luego segregan a células hijas diferentes. Las cromátidas hermanas permanecen unidas, por lo que tras la meiosis I se obtienen células hijas que contienen un único miembro de cada par cromosómico (cada uno de los cuales está constituido por dos cromátidas hermanas). Tras la meiosis I se produce la meiosis II, que se asemeja a la mitosis en que las cromátidas hermanas se separan y segregan a diferentes células hijas. Por tanto, la meiosis II da como resultado cuatro células hijas haploides, cada una de las cuales contiene una copia de cada cromosoma.

El apareamiento de los cromosomas homólogos tras la replicación del ADN no sólo es un proceso clave que subyace a la segregación de los cromosomas en la meiosis, sino que también permite la recombinación entre los cromosomas de origen paterno y materno. Este emparejamiento crucial de los cromosomas homólogos tiene lugar durante una larga profase en la meiosis I, que se divide en cinco etapas (**leptoteno, zigoteno, paquiteno, di-**

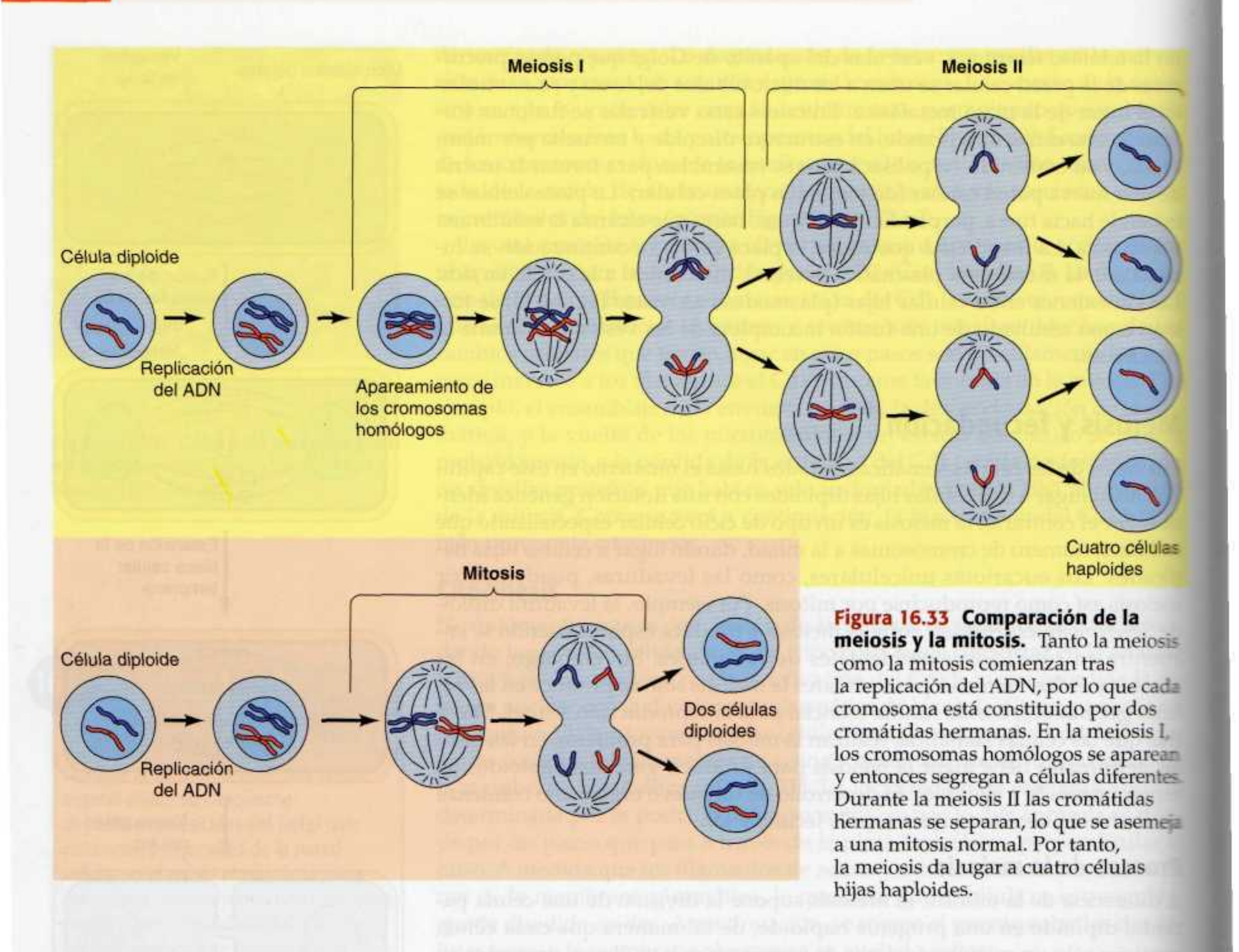


Figura 16.33 Comparación de la meiosis y la mitosis. Tanto la meiosis como la mitosis comienzan tras la replicación del ADN, por lo que cada cromosoma está constituido por dos cromátidas hermanas. En la meiosis I, los cromosomas homólogos se aparean y entonces segregan a células diferentes. Durante la meiosis II las cromátidas hermanas se separan, lo que se asemeja a una mitosis normal. Por tanto, la meiosis da lugar a cuatro células hijas haploides.

16.7 Animación web

Meiosis

Durante la meiois, una célula se divide para producir células hijas con la mitad del número de cromosomas que una célula parental.

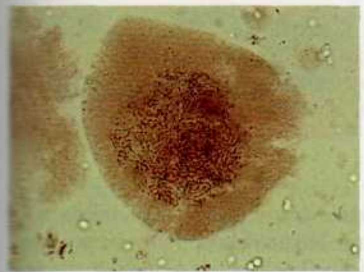
16.8 Animación web

Comparación de meiosis I y mitosis

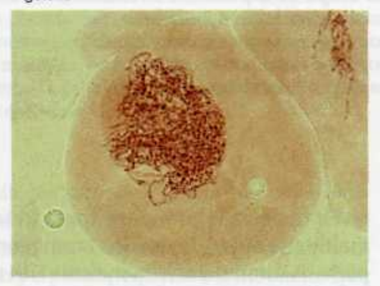
Una diferencia entre la mitosis y la meiosis puede observarse durante la metafase –durante la mitosis, los cromosomas homólogos se alinean separadamente sobre la placa metafásica, mientras que en la metafase de la meiosis I, los cromosomas homólogos se alinean por parejas en la placa metafásica.

ploteno y **diacinesis**) en función de la morfología cromosómica (Fig. 16.34). La recombinación se produce con una elevada frecuencia durante la meiosis, y se inicia por roturas de doble hebra que se inducen en la profase temprana meiótica (leptoteno) por la acción de una endonucleasa altamente conservada denominada Spo11. Como se estudió en el Capítulo 6, la formación de roturas de doble hebra lleva a la formación de regiones de hebra sencilla que invaden un cromosoma homólogo mediante el apareamiento de bases complementarias (véase Fig. 6.33). La asociación estrecha de los cromosomas homólogos (**sinapsis**) comienza durante la etapa de zigoteno. Durante esta etapa una estructura proteica a modo de cremallera, denominada complejo **sinaptonémico**, se forma a lo largo de los cromosomas apareados (Fig. 16.35). Este complejo mantiene a los cromosomas homólogos estrechamente unidos y alineados el uno con el otro durante la etapa de paquiteno, que se puede prolongar durante varios días. La recombinación entre los cromosomas homólogos se completa durante su asociación en la etapa de paquiteno, permaneciendo los cromosomas unidos en los lugares del sobrecruzamiento (**quiasmas**). Los complejos sinaptonémicos desaparecen en la etapa de diploteno, y los cromosomas homólogos se separan. Sin embargo, es importante destacar que permanecen unidos en los quiasmas, lo que es esencial para que se alineen correctamente en la metafase. Llegado este punto, cada par cromosómico (denominado bivalente) está constituido por cuatro cromátidas con quiasmas visibles (Fig. 16.36). La diacinesis, la

Leptoteno



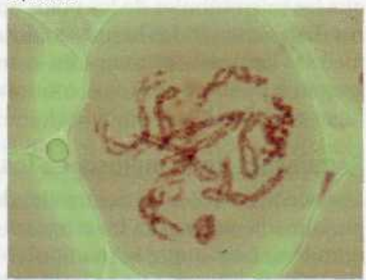
Zigoteno



Paquiteno



Diploteno



Diacinesis



Figura 16.34 Etapas de la profase de la meiosis I. Micrografías que muestran la morfología de los cromosomas del lirio. (C. Hasenkampf/ Biological Photo Service.)

etapa final de la profase I, supone la transición a la metafase, durante la que los cromosomas se condensan por completo.

Durante la metafase I, los cromosomas bivalentes se alinean en el huso. A diferencia de la mitosis (véase Fig. 16.28), los cinetocoros de las cromátidas hermanas están adyacentes el uno al otro y se orientan en la misma dirección, mientras que los cinetocoros de los cromosomas homólogos están dirigidos hacia los polos opuestos del huso (Fig. 16.37). Por tanto, los microtúbulos del mismo polo del huso se unen a las cromátidas hermanas, mientras que los microtúbulos de polos opuestos se unen a los cromosomas homólogos. La anafase I comienza con la rotura de los quiasmas por los que se mantienen unidos los cromosomas homólogos. Entonces los cromosomas homólogos se separan, mientras que las cromátidas hermanas permanecen unidas por sus centrómeros. Por tanto, tras finalizar la meiosis I, cada célula hija ha recibido un miembro de cada par de homólogos, constituido por dos cromátidas hermanas.

16.9 Animación web

Profase I de la meiosis

La profase I de la meiosis consiste en cinco estadios, durante los cuales los cromosomas se condensan y los cromosomas homólogos se emparejan entre sí y se recombinan.

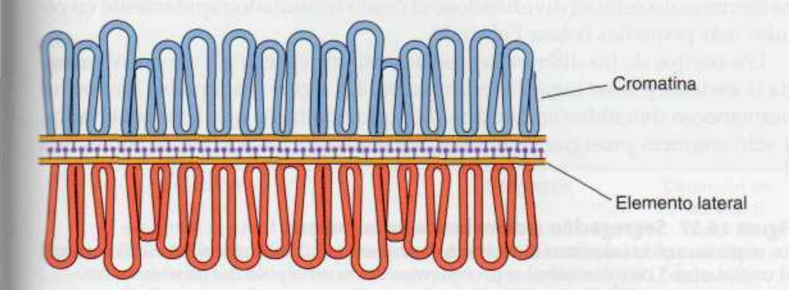


Figura 16.35 Complejo sinaptonémico. Los bucles de cromatina se anclan a los elementos laterales, que están unidos mediante un elemento central con una estructura a modo de cremallera.



Figura 16.36 Cromosoma bivalente en la etapa de diploteno. El cromosoma bivalente está constituido por los cromosomas homólogos apareados. Las cromátidas hermanas de cada cromosoma se unen por el centrómero. Las cromátidas de los cromosomas homólogos se unen por los quiasmas, que son los sitios donde se ha producido la recombinación genética. (B. John/Visuals Unlimited.)

La meiosis II comienza inmediatamente después de la citocinesis, normalmente antes de que los cromosomas se hayan descondensado por completo. A diferencia de la meiosis I, la meiosis II se asemeja a una mitosis normal. En la metafase II, los cromosomas se alinean en el huso de tal manera que los microtúbulos de los polos opuestos del huso se unen a los cinetocoros de las cromátidas hermanas. La unión entre los centrómeros de las cromátidas hermanas se rompe en la anafase II, y las cromátidas hermanas segregan a polos opuestos. A continuación se produce la citocinesis, dando lugar a células hijas haploides.

16.10 **Animación web**

Formación de cuerpos polares

Durante la meiosis en las hembras de vertebrados, las divisiones meióticas a menudo son asimétricas, resultando en un solo ovocito grande y cuerpos polares mucho más pequeños.

Regulación de la meiosis en los oocitos

Los oocitos (óvulos en desarrollo) de los vertebrados han sido modelos especialmente útiles para investigar el ciclo celular debido, en gran parte, a su gran tamaño y a que se manipulan fácilmente en el laboratorio. Un claro ejemplo de esto, que ya se trató anteriormente en este capítulo, lo proporciona el descubrimiento y la posterior purificación del MPF (Cdk1/ciclina B) de oocitos de rana. La meiosis de estos oocitos, al igual que la de otras especies, se regula en dos únicos puntos del ciclo celular, y los estudios sobre la meiosis de los oocitos han dado a conocer nuevos mecanismos de control del ciclo celular.

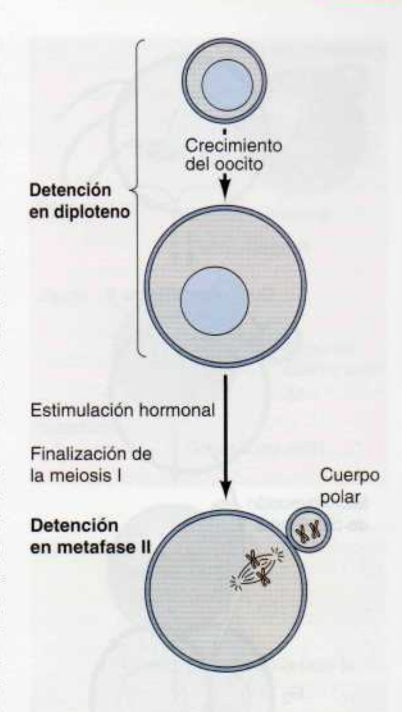
El primer punto de regulación de la meiosis de los oocitos aparece en la etapa de diploteno de la primera división meiótica (Fig. 16.38). Los oocitos pueden permanecer detenidos en esta etapa durante largos períodos de tiempo —hasta 40 o 50 años en el ser humano—. Mientras permanecen detenidos en diploteno, los cromosomas de los oocitos se descondensan y se transcriben activamente. Esta actividad transcripcional se refleja en el gran crecimiento de los oocitos durante este período. Por ejemplo, los oocitos humanos tienen cerca de 100 μm de diámetro (más de cien veces el volumen de una célula somática típica). Los oocitos de rana son incluso mayores, con diámetros aproximadamente de 1 mm. Durante este período de crecimiento celular los oocitos acumulan gran cantidad de material de reserva, incluyendo ARN y proteínas, que se necesitan para mantener el desarrollo temprano del embrión. Como ya se mencionó anteriormente en este capítulo, los ciclos celulares embrionarios tempranos tienen lugar sin que se produzca crecimiento celular, dividiéndose el óvulo fecundado rápidamente en células más pequeñas (véase Fig. 16.2).

Los oocitos de las diferentes especies varían respecto a cuándo se reanuda la meiosis y tiene lugar la fecundación. En algunos animales, los oocitos permanecen detenidos en la etapa de diploteno hasta que son fecundados, y sólo entonces prosigue la meiosis. Sin embargo, los oocitos de la mayoría

Metafase I
Quiasma
Microtúbulos del huso
Cinetocoros de las cromátidas hermanas
Anafase I

Figura 16.37 Segregación cromosómica en la meiosis I. En la metafase I, los cinetocoros de las cromátidas hermanas se encuentran fusionados o adyacentes el uno al otro. Los microtúbulos procedentes del mismo polo del huso se unen a los cinetocoros de las cromátidas hermanas, mientras que los microtúbulos procedentes de polos opuestos se anclan a los cinetocoros de cromosomas homólogos. Los quiasmas se rompen en la anafase I y los cromosomas homólogos migran a polos opuestos del huso.

Figura 16.38 Meiosis de los oocitos de los vertebrados. La meiosis se detiene en la etapa de diploteno, durante la que los oocitos crecen hasta alcanzar un gran tamaño. Entonces los oocitos reanudan la meiosis en respuesta a la estimulación hormonal y completan la primera división meiótica, en la que una citocinesis asimétrica da lugar a un cuerpo polar pequeño. La mayoría de los oocitos de los vertebrados vuelve a detenerse en la metafase II.



de los vertebrados (incluyendo las ranas, los ratones y los humanos) reanudan la meiosis en repuesta a una estimulación hormonal y prosiguen a través de la meiosis I antes de la fecundación. La división celular tras la meiosis I es asimétrica, dando lugar a un **cuerpo polar** pequeño y a un oocito que mantiene su gran tamaño. Entonces el oocito se dispone a entrar en la meiosis II sin haber reconstituido el núcleo o sin que se hayan descondensado sus cromosomas. La mayoría de los oocitos de los vertebrados se vuelve a detener en la metafase II, donde permanecen hasta la fecundación.

Al igual que la fase M de las células somáticas, la meiosis de los oocitos está controlada por la actividad de los complejos Cdk1/ciclina B. La regulación de Cdk1 durante la meiosis de los oocitos manifiesta características únicas que son responsables de la progresión meiosis I a la meiosis II y de la detención en la metafase II (Fig. 16.39). La estimulación hormonal de los oocitos detenidos en diploteno hace que se reanude la meiosis al activar a Cdk1, al igual que sucede en el paso de G_2 a M en las células somáticas. Entonces, al igual que en la mitosis, Cdk1 induce la condensación de los cromosomas, la rotura de la envuelta nuclear, y la formación del huso. A partir de aquí, la activación del complejo B promotor de la anafase ciclosoma (APC/C) induce el paso de metafase a anafase de la meiosis I, junto con una disminución en la actividad del Cdk1. Sin embargo, en contraste con la mitosis, la actividad de Cdk1 sólo se ve parcialmente reducida, de modo que el oocito permanece en la fase M, la cromatina permanece condensada, y las

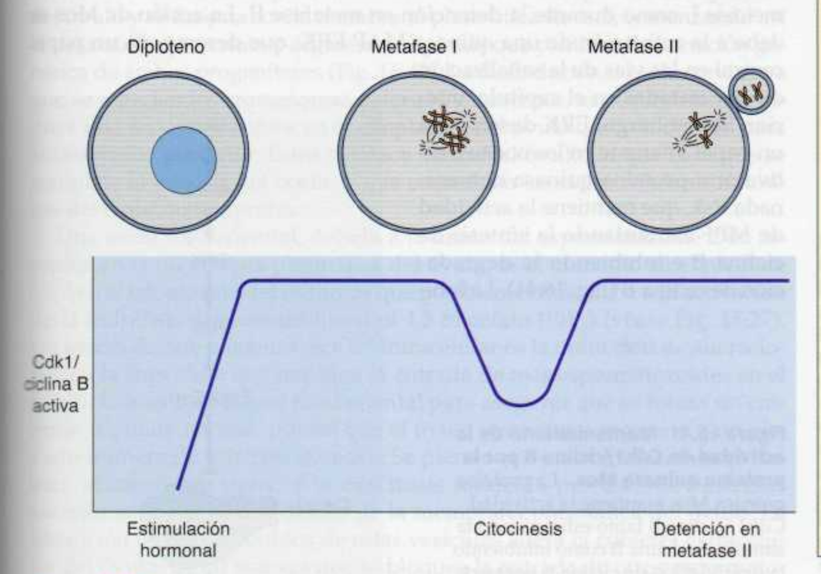


Figura 16.39 Actividad del Cdk1/ciclina B durante la meiosis de los oocitos. La estimulación hormonal de los oocitos en diploteno activa al Cdk1/ciclina B, lo que da lugar a que se pase a la metafase I. La actividad de Cdk1/ciclina B sólo disminuye parcialmente en la transición de metafase I a anafase I, y el oocito permanece en fase M. Una vez completada la meiosis I, la actividad de Cdk1/ciclina B aumenta de nuevo y permanece elevada durante la detención en metafase II.

Los animales pueden clonarse mediante el procedimiento de la transferencia nuclear de células somáticas en el que el núcleo de una célula somática es transferido a un oocito en metafase II en el cual se han eliminado los cromosomas normales. A continuación, el oocito se estimula para que empiece la división y, tras su implantación en una madre adoptiva, puede dar lugar a un animal genéticamente idéntico al donante del núcleo de la célula somática. Desde la clonación de la oveja Dolly en 1997, esta tecnología se ha utilizado para crear descendencia clonada de diversas especies de mamífero. También ofrece el potencial del clonaje terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades humanas.

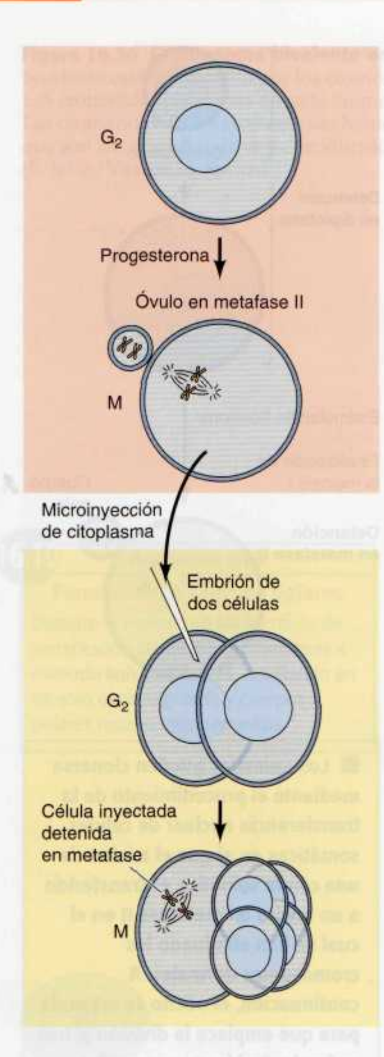


Figura 16.40 Identificación del factor citostático. Se microinyecta el citoplasma de un óvulo en metafase II en una célula de un embrión constituido por dos células. La célula embrionaria inyectada se detiene en metafase, mientras que la célula que no ha sido inyectada continúa su división. Por tanto, un factor en el citoplasma del óvulo en metafase II (factor citostático) ha inducido la detención en metafase de la célula embrionaria inyectada.

envueltas nucleares no se vuelven a formar. Después de la citocinesis, aumenta de nuevo la actividad de Cdk1 y se mantiene durante el tiempo que el óvulo permanece detenido en metafase II. Por tanto, un mecanismo regulador único de los oocitos mantiene la actividad del Cdk1 durante la transición de metafase a anafase de la meiosis I y la subsiguiente detención en metafase II, lo que bloquea el paso de metafase a anafase en la meiosis II y la inactivación del Cdk1 que tendría lugar debido a la proteólisis de la ciclina B durante una fase M normal.

El factor responsable de la detención en la metafase II lo identificaron por primera vez Yoshio Mashui y Clement Markert en 1971, en el mismo conjunto de experimentos que llevaron al descubrimiento del MPF. Sin embargo, en este caso, se inyectó el citoplasma de un huevo que estaba detenido en la metafase II en una célula de embrión temprano que estaba sufriendo ciclos celulares mitóticos (Fig. 16.40). Tras esta inyección del citoplasma del huevo, la célula embrionaria se detuvo en metafase, lo que indicaba que la detención en la metafase se inducía por un factor citoplasmático presente en el huevo. Debido a que este factor detenía la mitosis, se le denominó **factor citostático (CSF)**.

Experimentos más recientes han identificado a una proteína serina/treonina quinasa denominada **Mos** como un componente fundamental del CSF. Mos se sintetiza específicamente en los oocitos, alrededor del final de la meiosis I, y entonces se requiere tanto para el mantenimiento de la actividad del Cdk1/ciclina B durante la transición de metafase a anafase de la meiosis I, como durante la detención en metafase II. La acción de Mos se debe a la activación de una quinasa MAP ERK, que desempeña un papel central en las vías de la señalización celular tratadas en el capítulo anterior. Sin embargo, ERK desempeña un papel diferente en los oocitos; activa otra proteína quinasa denominada Rsk, que mantiene la actividad de MPF estimulando la síntesis de ciclina B e inhibiendo la degradación de ciclina B (Fig. 16.41). La inhi-

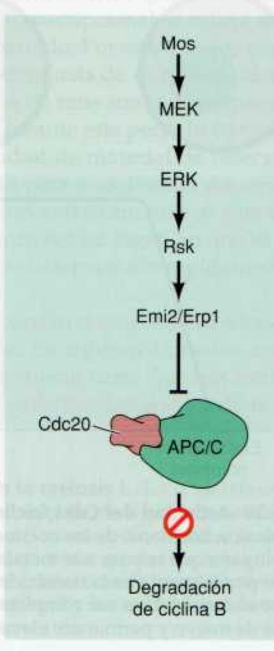


Figura 16.41 Mantenimiento de la actividad de Cdk1/ciclina B por la proteína quinasa Mos. La proteína quinasa Mos mantiene la actividad Cdk1/ciclina B tanto estimulando la síntesis de ciclina B como inhibiendo la degradación de ciclina B por parte del complejo promotor de la anafase ciclosoma (APC/C). Las proteína quinasas MEK, ERK y Rsk modulan la acción de Mos. Rsk fosforila la proteína Emi2/Erp1, la cual inhibe al complejo APC/C al unirse a Cdc20.

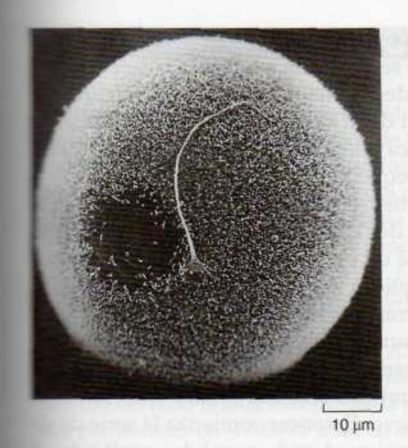


Figura 16.42 Fecundación. Micrografía electrónica de barrido de un espermatozoide humano fecundando un óvulo. (David M. Philips/Visuals Unlimited.)

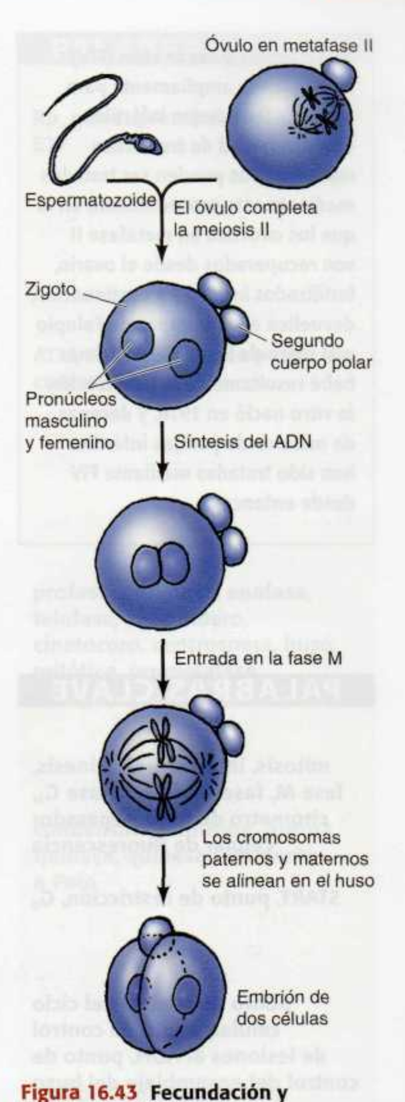


Figura 16.43 Fecundación y finalización de la meiosis. La fecundación induce el paso de la metafase II a la anafase II, lo que da lugar a que se complete la meiosis del oocito y a la formación de un segundo cuerpo polar (que normalmente degenera). El núcleo del espermatozoide se descondensa, por lo que el óvulo fecundado (zigoto) contiene dos núcleos haploides (pronúcleos masculino y femenino). En los mamíferos, los pronúcleos replican su ADN a medida que se aproximan. Entonces comienza la mitosis, y los cromosomas procedentes de ambos núcleos se alinean en un huso mitótico común. Por tanto, tras la mitosis y la citocinesis se obtiene un embrión formado por dos células y cada una de ellas contiene un genoma diploide.

bición de la ciclina B está mediada por la inhibición del complejo promotor de la anafase APC/C por una proteína conocida como Emi2/Erp1, que es fosforilada por acción de Rsk e inhibe a este complejo a través de su interacción con Cdc20 —de manera semejante a la detención del ciclo en el punto de control del ensamblaje del huso por parte de las proteínas Mad/Bub (véase Fig. 16.29)—. Así, Mos mantiene la actividad de Cdk1/ciclina B durante la meiosis de oocitos, dando lugar a la detención de oocitos en la metafase II. Los oocitos pueden permanecer detenidos en este punto del ciclo celular meiótico durante varios días, esperando la fertilización.

Fecundación

En la **fecundación**, el espermatozoide se une a un receptor en la superficie del óvulo y se fusiona con la membrana plasmática de éste, comenzando así el desarrollo de un nuevo organismo diploide que contiene información genética de ambos progenitores (Fig. 16.42). La fecundación no sólo conduce a que se mezclen los cromosomas paternos y maternos, sino que también induce una serie de cambios en el citoplasma del óvulo que son críticos para el desarrollo posterior. Estos cambios activan al óvulo, lo que hace que se complete la meiosis del oocito y que comiencen los ciclos celulares mitóticos del embrión temprano.

Una señal fundamental, debida a la unión del espermatozoide a su receptor en la membrana plasmática del óvulo, es el aumento en el nivel de Ca^{2+} en el citoplasma del óvulo, lo que posiblemente se deba a la activación de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) (véase Fig. 15.27). Un efecto de este aumento de Ca^{2+} intracelular es la inducción de alteraciones en la superficie que impiden la entrada de más espermatozoides en el óvulo. Este es un proceso fundamental para asegurar que se forma un embrión diploide normal, puesto que el óvulo permanece expuesto a un elevado número de espermatozoides. Se piensa que estas alteraciones se deben, al menos en parte, a la exocitosis inducida por Ca^{2+} de vesículas secretoras que abundan debajo de la membrana plasmática del óvulo. La liberación de los contenidos de estas vesículas altera la cubierta extracelular del óvulo, de tal manera que se bloquea la entrada de otros espermatozoides.

El aumento del Ca^{2+} citosólico tras la fecundación también es una señal para que se complete la meiosis (Fig. 16.43). En los óvulos que permanecen detenidos en la metafase II, la transición de metafase a anafase se pone en marcha mediante la activación del complejo promotor de la anafase

■ La fertilización *in vitro* (FIV) es empleada ampliamente para ayudar a las parejas infértiles. Una diversidad de trastornos reproductivos pueden ser tratados mediante este procedimiento en el que los ovocitos en metafase II son recuperados desde el ovario, fertilizados *in vitro* y a continuación, devueltos a las trompas de Falopio o al útero de la madre. El primer bebé resultante de la fertilización *in vitro* nació en 1978, y decenas de millares de parejas infértiles han sido tratadas mediante FIV desde entonces.

APC/C, resultando de la fosforilación degradación Ca^{2+}-dependiente del inhibidor del APC/C Emi2/Erp1 que se ocupa de mantener la detención de la metafase II (véase Fig. 16.41). La degradación resultante de ciclina B y condensina da lugar a la compleción de la segunda división meiótica, teniendo lugar una citocinesis asimétrica (al igual que en la meiosis I) y produciendo un segundo cuerpo polar pequeño.

Una vez que se ha completado la meiosis del oocito, el óvulo fecundado (ahora denominado **zigoto**) contiene dos núcleos haploides (denominados **pronúcleos**), cada uno proveniente de un progenitor. En los mamíferos, los dos pronúcleos entran en fase S y replican su ADN a la vez que migran el uno hacia el otro. Cuando se encuentran, el zigoto entra en la fase M de su primera división mitótica. Las dos envueltas nucleares se rompen, y los cromosomas condensados de origen paterno y materno se alinean en un mismo huso. El resultado al finalizar la mitosis son dos células embrionarias, cada una con un genoma diploide nuevo. Entonces comienza la serie de divisiones celulares que, en último término, dará lugar al desarrollo de un nuevo organismo.

PALABRAS CLAVE

mitosis, interfase, citocinesis, fase M, fase G_1, fase S, fase G_2, citómetro de flujo, separador celular de fluorescencia

START, punto de restricción, G_0

punto de control del ciclo celular, punto de control de lesiones al ADN, punto de control del ensamblaje del huso

factor promotor de la maduración (MPF), Cdk1, ciclina

G_1, ciclina, Cln, Cdk, Inhibidor de Cdk (CKI)

RESUMEN

CICLO CELULAR EUCARIOTA

Fases del ciclo celular: El ciclo celular de las células eucariotas se divide en cuatro fases diferenciadas: M, G_1, S, y G_2. La fase M consiste en la mitosis, a la que suele seguir la citocinesis. La fase S es el período de la replicación del ADN.

Regulación del ciclo celular por el crecimiento celular y por señales extracelulares: Las señales extracelulares y el tamaño de la célula regulan la progresión a través de los puntos de control específicos del ciclo celular.

Puntos de control del ciclo celular: Los puntos de control y el control por retroalimentación, coordinan los procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular y detienen el transcurso del ciclo celular si el ADN resulta dañado.

Restringir la replicación del ADN a una vez por ciclo celular: Una vez que se ha realizado la replicación del ADN, se impide el comienzo de una nueva fase S hasta que la célula haya completado la mitosis.

REGULADORES DE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

Proteínas quinasas y la regulación del ciclo celular: El MPF es la molécula clave responsable de regular el paso de G_2 a M en todos los eucariotas. El MPF es un dímero constituido por la ciclina B y por la proteína quinasa Cdk1.

Familias de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas: Distintas parejas constituidas por ciclinas y proteína quinasas relacionadas con Cdk1 regulan la progresión a través de las diferentes etapas del ciclo celular. La actividad de las Cdk se regula mediante su asociación con las ciclinas, mediante fosforilaciones activadoras e inhibidoras, y mediante la unión de inhibidores de Cdk.

RESUMEN

Factores de crecimiento y la regulación de las Cdk de G_1: Los factores de crecimiento estimulan la proliferación de las células animales induciendo la síntesis de ciclinas de tipo D. Entonces los complejos Cdk4, 6/ciclina D intervienen llevando a las células a través del punto de restricción en G_1. Un sustrato clave de los complejos Cdk4, 6/ciclina D es la proteína supresora de tumores Rb, que regula la transcripción de genes que requieren la progresión del ciclo celular, incluyendo la ciclina E. La activación de los complejos de Cdk2/ciclina E es, por tanto, responsable de la entrada en la fase S.

Puntos de control de lesiones en el ADN: El ADN lesionado o incompletamente replicado detienen la progresión del ciclo celular en G_1, S y G_2. La detención del ciclo celular está mediada por proteínas quinasas que son activadas por lesiones en el ADN e inhiben las Cdc25 fosfatasas, que son necesarias para la activación de las Cdk. En las células de mamífero, la detención en el punto de control de G_1 también está mediada por p53, que induce la síntesis del inhibidor de Cdk p21.

ACONTECIMIENTOS DE LA FASE M

Etapas de la mitosis: Clásicamente, la mitosis se divide en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. Los procesos fundamentales de la mitosis incluyen la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico, la rotura de la envuelta nuclear, y la unión de los microtúbulos del huso al cinetocoro de los cromosomas. Entonces las cromátidas hermanas se separan y migran a los polos opuestos del huso. Por último, se vuelven a formar los núcleos, los cromosomas se descondensan y la citocinesis divide a la célula en dos.

Cdk1/ciclina B y la progresión hacia la metafase: la fase M comienza por la activación del Cdk1/ciclina B, que fosforila otras proteína quinasas así como a lamininas nucleares y otras proteínas de la envuelta nuclear, las condensinas y proteínas de la matriz del Golgi. La activación de Cdk1/ciclina B es responsable de la condensación de la cromatina, de la rotura de la envuelta nuclear, de la fragmentación del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, y de la reorganización de los microtúbulos para formar el huso mitótico. El anclaje de los microtúbulos del huso a los cinetocoros de las cromátidas hermanas conducirá a que éstas se alineen en la placa metafásica.

El punto de control de ensamblaje del huso y progresión hacia anafase: La activación de una ubiquitina ligasa denominada complejo promotor de la anafase ciclosoma (APC/C) provoca la degradación de proteínas reguladoras clave en la transición de la metafase a la anafase. La actividad del complejo promotor de la anafase está inhibida hasta que la célula supera el punto de control de ensamblaje del huso y todos los cromosomas se encuentran correctamente alineados sobre el uso. La proteólisis mediada por ubiquitinas, que la inició el complejo promotor de la anafase, induce la degradación de la cohesina, lo que rompe la unión entre las cromátidas hermanas al inicio de la anafase. El complejo promotor de la anafase APC/C también ubiquitiniza a la ciclina B, desencadenando la activación de Cdk1 y la salida de la mitosis.

Citocinesis: La inactivación del Cdk1/ciclina B también induce la citocinesis. En las células animales la citocinesis se produce debido a la contracción de un anillo constituido por filamentos de actina y miosina. En las células de los vegetales superiores la citocinesis se lleva a cabo mediante la formación de una pared celular y de una membrana plasmática nueva en el interior de la célula.

PALABRAS CLAVE

Rb, gen supresor de tumores, E2F

ATM, ATR, quinasa de punto de control, p53

profase, metafase, anafase, telofase, centrómero, cinetocoro, centrosoma, huso mitótico, prometafase

condensina, cohesina, Aurora quinasa, quinasa semejante a Polo

complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C)

anillo contráctil

PALABRAS CLAVE

meiosis, leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno, diacinesis, sinapsis, complejo sinaptonémico, quiasma

cuerpo polar, factor citostático (CSF), Mos

fecundación, zigoto, pronúcleo

RESUMEN

MEIOSIS Y FECUNDACIÓN

Proceso de la meiosis: La meiosis es un ciclo celular especializado que da lugar a células hijas haploides. A una única ronda de replicación del ADN le siguen dos divisiones celulares consecutivas. Durante la meiosis I, los cromosomas homólogos primero se aparean y luego segregan a células hijas diferentes. La meiosis II se asemeja a una mitosis normal, en la que se separan las cromátidas hermanas.

Regulación de la meiosis en los oocitos: La meiosis de los oocitos de los vertebrados se regula en dos únicos sitios del ciclo celular: en la fase de diploteno en la meiosis I, y en la metafase en la meiosis II. La detención en la metafase II se debe a que el factor promotor de la mitosis es inhibido por una proteína quinasa que se expresa en los oocitos.

Fecundación: La fecundación induce la reanudación de la meiosis en el oocito mediante una activación, dependiente de Ca^{2+}, del complejo promotor de la anafase APC/C. El óvulo fecundado contendrá dos núcleos haploides que formarán un nuevo genoma diploide, y comenzarán las divisiones celulares embrionarias.

Preguntas

1. ¿En qué se parecen las células en G_0 y G_1? ¿En qué difieren?

2. Considérese una célula de mamífero que se divide cada 30 horas. La observación al microscopio indica que, en un momento dado, se encuentran en mitosis el 3,3% de las células. Tras el análisis por el citómetro de flujo se establece que el 53,3% de las células tiene una cantidad de ADN de $2n$, el 16,7% tiene una cantidad de $4n$, y el 30% tiene una cantidad que oscila entre $2n$ y $4n$. ¿Cuál es la duración de las fases G_1, S, G_2 y M del ciclo de estas células?

3. La radiación daña al ADN y detiene la progresión del ciclo celular en puntos de control en G_1, S y G_2. ¿Por qué resulta ventajoso para las células dañadas?

4. ¿Cuáles son los mecanismos que regulan la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas?

5. El punto de control del huso retrasa el comienzo de la anafase hasta que todos los cromosomas se encuentran correctamente alineados sobre el huso. ¿Cuál sería el resultado si un fallo de este punto de control permitiese que se iniciara la anafase mientras uno de los cromosomas todavía se encontrase unido a los microtúbulos de un único centrosoma?

6. ¿Qué procesos celulares se verían afectados por la expresión de ARNsi dirigido frente a Cdk7?

7. El inhibidor de Cdk, p16, se une de manera específica a los complejos Cdk4, 6/ciclina D. ¿Cuál sería el efecto esperado de una sobreexpresión de p16 sobre la progresión del ciclo celular? ¿Afectaría la sobreexpresión de p16 a una célula tumoral que careciera de la proteína Rb funcional?

8. La mutagénesis *in vitro* de ADNc de lámina clonados se ha utilizado para producir mutantes que no pueden ser fosforilados por Cdk1. ¿Cómo afectaría la expresión de estas lamininas mutantes a la ruptura de la envuelta nuclear al final de la profase?

9. ¿Qué sustratos son fosforilados por Cdk1/ciclina B para iniciar la mitosis?

10. Se han generado mutantes de la ciclina B que son resistentes a la degradación por la proteasa ciclosoma (APC/C) de la ciclina B. ¿Cómo afectaría la expresión de estas ciclinas B mutantes a la transición de la metafase a la anafase?

11. ¿Cómo desencadena la actividad del complejo promotor de la anafase ciclosoma (APC/C) la separación de las cromátidas hermanas?

12. Se ha utilizado la recombinación homóloga para inactivar el gen *mos* en ratones. ¿Qué se esperaría que causara esto en la meiosis de los oocitos?

13. ¿Cómo proporciona el óvulo fertilizado un bloqueo duradero a la entrada adicional de espermatozoides en el óvulo?

Bibliografía

Referencias generales

Morgan, D. O. 2007. *The Cell Cycle: Principles of Control*. Oxford Univ. Press.

Ciclo celular eucariota

Arias, E. E. and J. C. Walter. 2007. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev.* 21: 497–518. [R]

Blow, J. J. and A. Dutta. 2005. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 476–486. [R]

Cimprich, K. A. and D. Cortez. 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 616–627. [R]

Forsburg, S. L. and P. Nurse. 1991. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 227–256. [R]

Harper, J. W. and S. J. Elledge. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell* 28: 739–745. [R]

Hartwell, L. H. and T. A. Weinert. 1989. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629–634. [R]

Norbury, C. and P. Nurse. 1992. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 441–470. [R]

Pardee, A. B. 1989. G_1 events and the regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603–608. [R]

Russell, P. 1998. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem. Sci.* 23: 399–402. [R]

Sclafani, R. A. and T. M. Holzen. 2007. Cell cycle regulation of DNA replication. *Ann. Rev. Genet.* 41: 237–280. [R]

Reguladores de la progresión del ciclo celular

Bartek, J. and J. Lukas. 2007. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19: 238–245. [R]

Besson, A., S. F. Dowdy and J. M. Roberts. 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell* 14: 159–169. [R]

Bloom, J. and F. R. Cross. 2007. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 149–159. [R]

Boutros, R., V. Lobjois and B. Ducommun. 2007. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nature Rev. Cancer* 7: 495–507. [R]

Bracken, A. P., M. Ciro, A. Cocito and K. Helin. 2004. E2F target genes: Unraveling the biology. *Trends Biochem. Sci.* 29: 409–417. [R]

Dimova, D. K. and N. J. Dyson. 2005. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 24: 2810–2826. [R]

Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngbloom, D. Distel and T. Hunt. 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389–396. [P]

Giacinti, C. and A. Giordano. 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25: 5220–5227. [R]

Harper, J. W. and S. J. Elledge. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell* 28: 739–745. [R]

Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, J. Culotti and M. Culotti. 1973. Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of *cdc* mutants. *Genetics* 74: 267–287. [P]

Levine, A. J., W. Hu and Z. Feng. 2006. The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Diff.* 13: 1027–1036. [R]

Lohka, M. J., M. K. Hayes and J. L. Maller. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 3009–3013. [P]

Malumbres, M. and M. Barbacid. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 30: 630–641. [R]

Masui, Y. and C. L. Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177: 129–146. [P]

Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: Cyclins revisited. *Cell* 116: 221–234. [R]

Santamaria, D., C. Barriere, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J. F. Caceres, P. Dubus, M. Malumbres and M. Barbacid. 2007. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448: 811-816. [P]

Smith, L. D. and R. E. Ecker. 1971. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25: 232–247. [P]

Swenson, K. I., K. M. Farrell and J. V. Ruderman. 1986. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47: 861–870. [P]

Vousden, K. H. and D. P. Lane. 2007. p53 in health and disease. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 275–283. [R]

Acontecimientos de la fase M

Anderson, D. J. and M. W. Hetzer. 2008. The life cycle of the metazoan nuclear envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 1–7. [R]

Barr, F. A., H. H. W. Sillje and E. A. Nigg. 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 429–440. [R]

Blagden, S. P. and D. M. Glover. 2003. Polar expeditions—provisioning the centrosome for mitosis. *Nature Cell Biol.* 5: 505–511. [R]

Carmena, M. and W. C. Earnshaw. 2003. The cellular geography of Aurora kinases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 842–854. [R]

Cheeseman, I. M. and A. Desai. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 33–45. [R]

Colanzi, A. and D. Corda. 2007. Mitosis controls the Golgi and the Golgi controls mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19: 386–393. [R]

De Gramont, A. and O. Cohen-Fix. 2005. The many phases of anaphase. *Trends Biochem. Sci.* 30: 559–568. [R]

Gadde, S. and R. Heald. 2004. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr. Biol.* 14: R797–R805. [R]

Glotzer, M. 2005. The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307: 1735–1739. [R]

Hetzer, M. W., T. C. Walther and I. W. Mattaj. 2005. Pushing the envelope: Structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 347–380. [R]

Jurgens, G. 2005. Plant cytokinesis: Fission by fusion. *Trends Cell Biol.* 15: 277–283. [R]

Kline-Smith, S. L. and C. E. Walczak. 2004. Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: Refocusing on microtubule dynamics. *Mol. Cell* 15: 317–327. [R]

Losada, A. and T. Hirano. 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: The first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* 19: 1269–1287. [R]

Lowe, M. and F. A. Barr. 2007. Inheritance and biogenesis of organelles in the secretory pathway. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 429–439. [R]

Musacchio, A. and E. D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 379–393. [R]

Nasmyth, K. 2005. How do so few control so many? *Cell* 120: 739–746. [R]

Peters, J.-M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 644–656. [R]

Petronczki, M., P. Lenart and J.-M. Peters. 2008. Polo on the rise—from mitotic entry to cytokinesis with Plk1. *Dev. Cell* 14:646–659. [R]

Rieder, C. L. and A. Khodjakov. 2003. Mitosis through the microscope: Advances in seeing inside live dividing cells. *Science* 300: 91–96. [R]

Scholey, J. M., I. Brust-Mascher and A. Mogilner. 2003. Cell division. *Nature* 422: 746–752. [R]

Sullivan, M. and D. O. Morgan. 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 894–903. [R]

Wolfe, B. A. and K. L. Gould. 2005. Split decisions: Coordinating cytokinesis in yeast. *Trends Cell Biol.* 15: 10–18. [R]

Meiosis y fecundación

Bhalla, N. and A. F. Dernburg. 2008. Prelude to a division. *Ann. Rev. Cell Biol.* 24: 397–424. [R]

Ducibella, T. and R. Fissore. 2008. The role of Ca^{2+}, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Dev. Biol.* 315: 257–279. [R]

Inoue, D., M. Ohe, Y. Kanemori, T. Nobui and N. Sagata. 2007. A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. *Nature* 446: 1100–1104. [P]

Nishiyama, T., K. Ohsumi and T. Kishimoto. 2007. Phosphorylation of Erp1 by $p90^{rsk}$ is required for cytostatic factor arrest in *Xenopus laevis* eggs. *Nature* 446: 1096–1099. [P]

Page, S. L. and R. S. Hawley. 2003. Chromosome choreography: The meiotic ballet. *Science* 301: 785–789. [R]

Pawlowski, W. P. and W. Z. Cande. 2005. Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol.* 15: 674–681. [R]

Pesin, J. A. and T. L. Orr-Weaver. 2008. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Ann. Rev. Cell Biol.* 24: 475–499. [R]

Petronczki, M., M. F. Siomos and K. Nasmyth. 2003. Un ménage à quatre: The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423–440. [R]

CAPÍTULO 17

Muerte y renovación celular

LA MUERTE CELULAR Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR están equilibradas durante la vida de los organismos multicelulares. El desarrollo animal comienza con la rápida proliferación de las células embrionarias, que a continuación se diferencian para producir los diversos tipos de células especializados que componen los tejidos y órganos adultos. Mientras que el nematodo *C. elegans* consiste en tan solo 959 células somáticas, los humanos poseen un total de aproximadamente 10^{14} células, consistiendo en más de 200 tipos celulares diferenciados. Empezando a partir de una sola célula —el ovocito fertilizado— todos los diversos tipos celulares del cuerpo son producidos y organizados para formar tejidos y órganos. Este complejo proceso de desarrollo implica no sólo la proliferación y diferenciación celular, sino también la muerte celular. A pesar de que las células pueden morir como resultado de eventos traumáticos impredecibles, como la exposición a agentes químicos tóxicos, la mayoría de las muertes celulares en los organismos multicelulares ocurren como consecuencia de un proceso fisiológico normal de muerte celular programada, que juega un papel clave tanto en el desarrollo embrionario y en tejidos adultos.

En los organismos adultos, la muerte celular debe estar equilibrada con la renovación celular, y la mayoría de los tejidos contienen células madre que son capaces de reemplazar las células que se han perdido. Las anomalías de la muerte celular están asociadas con una amplia variedad de patologías, incluyendo el cáncer, las patologías autoinmunes y los trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer. Por el contrario, la capacidad de las células madre de proliferar y diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares ha generado un gran interés en su posible uso, particularmente las células madre embrionarias, para reemplazar tejidos dañados. Los mecanismos y la regulación de la muerte celular y la renovación celular se han, por tanto, convertido en áreas de investigación en la cabeza de la biología y la medicina.

Muerte celular programada

La **muerte celular programada** es estrechamente regulada de modo que el destino de las células individuales cumple las necesidades del organismo completo. En adultos, la muerte celular es responsable del equilibrio entre proliferación celular y el *mantenimiento de números celulares constantes* en los tejidos que sufren renovación ulular. Por ejemplo, unas 5×10^{11} células sanguíneas son eliminadas diariamente en el hombre mediante muerte

celular programada, equilibrando su continua producción en la médula ósea. Adicionalmente, la muerte celular programada proporciona un mecanismo de defensa por el cual las células dañadas y potencialmente peligrosas pueden ser eliminadas por el bien del organismo. Las células infectadas por virus con frecuencia sufren muerte celular programada, previniendo así la producción de nuevas partículas virales y limitando la propagación del virus a través del organismo hospedador. Otros tipos de agresiones celulares, como las lesiones del ADN, también inducen la muerte celular programada. En el caso del ADN lesionado, la muerte celular programada puede eliminar células que portan mutaciones potencialmente dañinas, incluyendo células con mutaciones que pueden dar lugar al desarrollo de cáncer.

Durante el desarrollo, la muerte celular programada juega un papel clave eliminando las células no deseadas de una variedad de tejidos. Por ejemplo, la muerte celular programada es responsable de la eliminación de los tejidos larvales durante la metamorfosis de anfibios e insectos, además de la eliminación de tejido interdigital durante la formación de los dedos. Otro ejemplo bien caracterizado de la muerte celular programada es proporcionado por el desarrollo del sistema nervioso en mamíferos. Las neuronas se producen en exceso, *y hasta un 50% de las neuronas en desarrollo son eliminadas* mediante muerte celular programada. Aquellas que sobreviven son seleccionadas por haber realizado las conexiones correctas con sus células diana, que secretan factores de crecimiento que señalizan la supervivencia mediante el bloqueo del programa de muerte celular neuronal. La supervivencia de muchos otros tipos de células en animales, depende, de forma similar, de factores de crecimiento o de contactos con células vecinas o la matriz extracelular, de modo que se cree que la muerte celular programada juega un papel importante en la regulación de las asociaciones entre células en los tejidos.

El término apoptosis deriva de la palabra griega que describe la caída de las hojas desde un árbol o los pétalos de una flor. Se tomó para diferenciar esta forma de muerte celular programada de las muertes celulares accidentales causadas por la inflamación o las lesiones.

Los eventos de la apoptosis

En contraste con la muerte accidental de las células que resulta de una lesión aguda (**necrosis**), la muerte celular programada es un proceso activo, que tiene lugar generalmente mediante una serie concreta de cambios celulares conocidos como **apoptosis**, descrita por primera vez en 1972 (Fig. 17.1). Durante la apoptosis, el ADN cromosómico generalmente es fragmentado como resultado de la escisión entre nucleosomas. La cromatina se condensa y a continuación el núcleo se disgrega en pequeños fragmentos. Finalmente, la celula encoge y se rompe en fragmentos envueltos de membrana denominados cuerpos apoptóticos.

Las células apoptóticas y los fragmentos celulares son reconocidos de forma eficaz y fagocitados mediante macrófagos y células vecinas, de modo que las células que mueren por apoptosis son rápidamente retiradas de los tejidos. Por el contrario, las células que mueren debido a necrosis como resultado de una lesión aguda se hinchan y se lisan, liberando su contenido al espacio extracelular y causando inflamación. La eliminación de células apoptóticas está mediada por la expresión de las señales denominadas «cómeme» presentes en la superficie celular. Estas señales incluyen a la fofatidilserina, que normalmente está restringida a la cara interna de la membrana plasmática (véase Fig. 13.2). Durante la apoptosis, la fosfatidilserina se expresa en la superficie celular donde es reconocida por receptores expresados en *las células fagocíticas* (Fig. 17.2).

17.1 Animación web

Apoptosis

Durante la apoptosis, el ADN cromosómico generalmente es fragmentado, la cromatina se condensa, el núcleo se fragmenta y la célula se encoge y se rompe formando los cuerpos apoptóticos.

Estudios pioneros de la muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans* proporcionaron conocimientos iniciales críticos que permitieron la comprensión del mecanismo molecular de la apoptosis. Estos estudios llevados a cabo en el laboratorio de Robert Horvitz inicialmente identificaron tres genes que juegan papeles clave en la regulación y ejecución de la apoptosis. Durante el desarrollo normal del nematodo, 131 células somá-

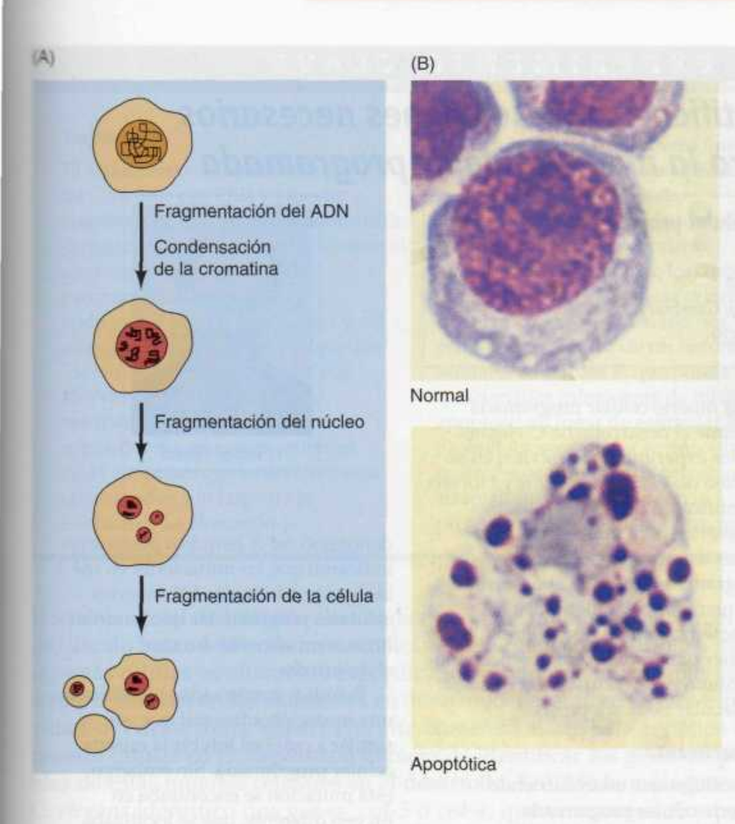


Figura 17.1 Apoptosis. (A) Representación esquemática de los eventos de la apoptosis. (B) Micrografías lumínicas de células leucémicas humanas normales y apoptóticas, ilustrando la condensación cromatínica y la fragmentación nuclear. (C) La electroforesis en gel de ADN procedente de células apoptóticas, mostrando su degradación en fragmentos correspondientes a múltiplos de 200 pares de bases (el tamaño de los nucleosomas) tras 1-4 horas desde inducción de la apoptosis. (B, cortesía de D.R. Green/La Jolla Institute for Allergy and Immunology; C, cortesía de Ken Adams, Boston University.)

Figura 17.2 Fagocitosis de las células apoptóticas. Las células apoptóticas y los fragmentos celulares son reconocidos y englobados por células fagocíticas. Una de las señales reconocidas por los fagocitos es la presencia de fosfatidilserina en la superficie celular. En las células normales, la fosfatidilserina está restringida a la membrana interna de la membrana plasmática, pero se expresa en la superficie celular durante la apoptosis.



EXPERIMENTO CLAVE

Identificación de los genes necesarios para la muerte celular programada

Control genético de la muerte celular programada en el nematodo *C. elegans*

Hilary M. Ellis y H. Robert Horvitz
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA
Cell, 1986, Volumen 44, págs. 817-829


H. Robert Horvitz

Contexto

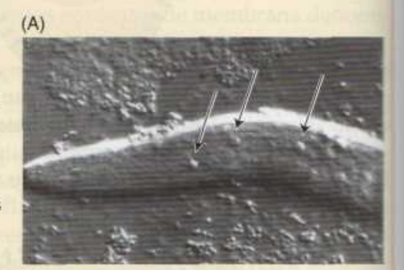
A partir de los años 1960 la muerte celular se reconocía como un evento normal durante el desarrollo animal, lo que implicaba que era un proceso estrechamente regulado en que células específicas estaban destinadas a morir. El nematodo sencillo *C. elegans*, que ha sido un sistema modelo de importancia crítica en la biología del desarrollo, resultó ser la clave de la comprensión tanto de la regulación como del mecanismo de dichas muertes celulares programadas. El análisis microscópico durante los años 1970 estableció un mapa completo del desarrollo de *C. elegans* de modo que el origen embrionario y el destino de cada una de las células era conocido. Notablemente, el desarrollo de *C. elegans* incluía un patrón muy específico de muertes celulares programadas. En particular, John Sulston y H. Robert Horvitz describieron en 1977 que el desarrollo de los nematodos adultos (formados por 959 células somáticas) implicaba la muerte programada de 131 células de las 1.090 que eran producidas inicialmente. Las mismas células morían en todos los embriones, indicando que la muerte de estas células era un evento normal durante el desarrollo, donde la muerte celular era un destino específico del desarrollo. También era notable que todas estas células moribundas sufrieran una serie de cambios morfológicos similares, lo que sugería que estas muertes celulares programadas ocurrían mediante un mecanismo común.

Basándose en estas consideraciones, Horvitz realizó un análisis genético con el objetivo de caracterizar el mecanismo y la regulación de la muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans*. En los experimentos descritos en su trabajo de 1986, Hilary Ellis y Horvitz identificaron dos genes que eran necesarios para que se produjeran todas las muertes celulares programadas durante el desarrollo del nematodo. La identificación y caracterización de estos genes fue un primer paso crítico que desencadenó la comprensión actual de la biología molecular de la apoptosis.

Experimento

Las células que están sufriendo muerte celular programada en *C. elegans* pueden identificarse de forma sencilla como células altamente refringentes bajo examen microscópico, de forma que Ellis y Horvitz pudieron emplear esta característica como ensayo para detectar animales mutantes en los que no se producían las muertes celulares normales. Para aislar mutantes que mostraban anomalías en la muerte celular, trataron nematodos con el mutágeno químico metanosulfonato de etilo, que reacciona con el ADN. La progenie de aproximadamente 4.000 gusanos fue examinada para identificar células moribundas, y se encontraron dos cepas mutantes en las que la muerte celular esperada no tenía lugar (véase figura). Ambas cepas mutantes contenían mutaciones recesivas en el mismo gen, que se denominó *ced-3*. Estudios posteriores indicaron que las mutaciones en *ced-3* bloqueaban todas las 131 muertes celulares programadas que tendrían lugar normalmente durante el desarrollo.

Estudios continuados identificaron una mutación adicional que era similar a *ced-3* en inhibir la muerte celular programada. Sin embargo, esta mutación se encontraba en un gen diferente, que se localizaba en un cromosoma distinto a *ced-3*. Este segundo gen se denominó *ced-4*. De forma similar a las mutaciones en *ced-3*, se observó que las mutaciones recesivas en *ced-4* bloqueaban todas las muertes celulares programadas en el gusano.

(A)


(B)


Fotomicrografías de un gusano normal (A) y de un mutante de *ced-3* (B). Las células moribundas son altamente refringentes y están indicadas mediante flechas en el panel A. Estas células no están presentes en el animal mutante.

EXPERIMENTO CLAVE

Impacto

El aislamiento de mutantes de *C. elegans* por Ellis y Horvitz constituyeron la primera identificación de genes que estaban implicados en el proceso de la muerte celular programada. Las proteínas codificadas por los genes *ced-3* y *ced-4*, además de por el gen *ced-9* (que fue identificado posteriormente por Horvitz y sus colaboradores), resultaron ser prototipos de reguladores y efectores centrales de la apoptosis que están altamente conservados a lo largo de la evolución. La clonación y secuenciación de *ced-3* reveló que estaba relacionado con una proteasa que había sido identificada previamente en células de mamífero, y que se convirtió en el primer miembro de la familia de las caspasas. El gen *ced-9* de *C. elegans* se relacionó con el oncogén *bcl-2*, aislado por primera vez a partir de un linfoma humano de células B, que poseía la característica infrecuente de inhibir la apoptosis en lugar de estimular la proliferación celular. Y se encontró que *ced-4* codificaba una proteína adaptadora relacionada con la proteína Apaf-1 de mamíferos, que es necesaria para la activación de las caspasas. La identificación de estos genes en *C. elegans* desencadenó así la comprensión de la base molecular de la apoptosis, con amplias implicaciones tanto para el desarrollo como para el mantenimiento de los tejidos adultos normales. Desde que anomalías en la apoptosis contribuyen a una amplia variedad de patologías, incluyendo el cáncer, las patologías autoinmunes y los trastornos neurodegenerativos, los hallazgos iniciales de Ellis y Horvitz han tenido impacto sobre amplias áreas de la biología y la medicina.

ticas de un total de 1090 son eliminadas mediante muerte celular programada, dando lugar a 959 células somáticas en el organismo adulto. La muerte de estas células es altamente específica, de modo que las mismas células siempre mueren en los embriones en desarrollo. Basándose en esta especificidad del desarrollo, Robert Horvitz comenzó el análisis genético de la muerte celular en *C. elegans* con la meta de identificar los genes responsables de estas muertes celulares en el desarrollo. En 1986 la mutagénesis de *C. elegans* identificó dos genes, *ced-3* o *ced-4*, que eran necesarios para la muerte celular durante el desarrollo. Si *ced-3* o *ced-4* eran inactivados mediante una mutación, la muerte celular programada no tenía lugar. Un tercer gen, *ced-9*, funcionaba como un regulador negativo de la apoptosis. Si *ced-9* era inactivado mediante una mutación, las células que normalmente sobrevivirían no lo hacían, sino que sufrían apoptosis, desencadenando la muerte del animal en desarrollo. Por el contrario, si *ced-9* era expresado a niveles muy elevados, la muerte celular programada normal no ocurría. Estudios posteriores indicaron que las proteínas codificadas por estos genes actuaban en una vía en la que Ced-4 actuaba para estimular a Ced-3, y Ced-9 inhibía a Ced-4 (Fig. 17.3). Genes semejantes a *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* también han sido identificados en *Drosophila* y en mamíferos, y se ha descubierto que codifican proteínas que representan efectores y reguladores de la apoptosis conservados, inducidos por diversos estímulos.

Caspasas: Los ejecutores de la apoptosis

La clonación molecular y la secuenciación nucleotídica del gen *ced-3* indicaron que codificaba una proteasa, proporcionando la primera señal sobre el mecanismo molecular de la apoptosis. Actualmente se sabe que Ced-3 es un prototipo de una familia de más de una docena de proteasas, conocidas como **caspasas** porque poseen residuos de cisteína (C) en sus centros acti-

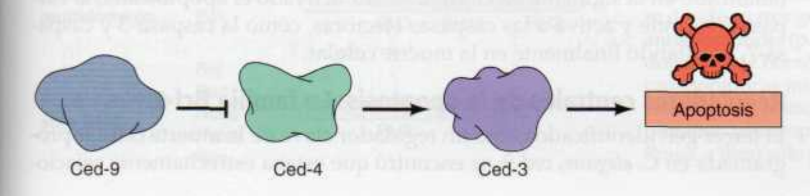


Figura 17.3 Muerte celular programada en *C. elegans*. El análisis genético identificó tres genes que juegan papeles clave en la muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans*. Dos genes, *ced-3* y *ced-4*, son necesarios para la muerte celular, mientras que *ced-9* inhibe la muerte celular. La proteína Ced-9 actúa corriente arriba de Ced-4, que activa a Ced-3.

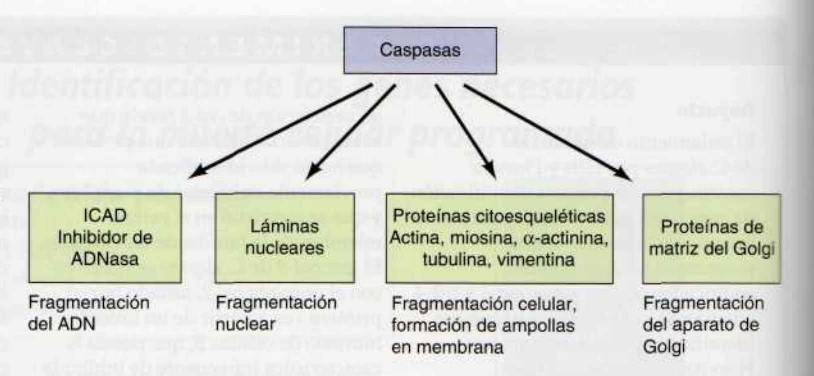


Figura 17.4 Dianas de las caspasas. Las caspasas escinden a más de 100 proteínas celulares para inducir los cambios morfológicos típicos de la apoptosis. Entre las dianas de las caspasas figuran un inhibidor de ADNasa (ICAD), láminas nucleares, proteínas del citoesqueleto, y proteínas de matriz del Golgi.

vos y escinden detrás de residuos de ácido aspártico (Asp) en sus proteínas sustrato. Las caspasas son los últimos efectores o ejecutores de la muerte celular programada, desencadenando los eventos de la apoptosis mediante la escisión de más de 100 proteínas celulares diana diferentes (Fig. 17.4). Una diana clave de las caspasas incluyen un inhibidor de una ADNasas, que cuando está activada es responsable de la fragmentación del ADN nuclear. Adicionalmente, las caspasas escinden ambas láminas nucleares, dando lugar a la fragmentación del núcleo, y las proteínas citoesqueléticas, desencadenando la desorganización del citoesquelto, la vesiculización de la membrana y la fragmentación celular; y las proteínas de matriz del Golgi, lo que induce la fragmentación de este aparato. De igual modo, la traslocación de la fosfatidilserina a la superficie celular depende de las caspasas, aunque no se han identificado aún la(s) diana(s) de las caspasas que modifican la membrana plasmática.

Ced-3 es la única caspasa de *C. elegans*. Sin embargo, en *Drosophila* y los mamíferos se han identificado, al menos, siete caspasas, designadas como caspasas *iniciadoras* o *efectoras*, que intervienen en una cascada cuyo resultado final es la apoptosis. Las caspasas se sintetizan en forma de precursores inactivos que pueden convertirse en su forma activa en una reacción de escisión proteolítica catalizada por otras caspasas. Las caspasas iniciadoras se activan directamente como respuesta a las distintas señales que inducen la apoptosis como se abordará en una sección posterior de este capítulo. A continuación, las caspasas efectoras escinden y activan a las caspasas efectoras, que se ocupan de digerir a las proteínas celulares diana que intervienen en las distintas etapas de la apoptosis (véase Fig. 17.4). Por consiguiente, la activación de una caspasa iniciadora pone en marcha una reacción en cadena de la polimerasa de activación de caspasas que conduce a la muerte de la célula.

El análisis genético en *C. elegans* inicialmente sugería que Ced-4 funcionaba como un activador de la caspasa Ced-3. Estudios subsiguientes han demostrado que Ced-4 y su homólogo en mamíferos (Apaf-1) se une a las caspasas y estimula su activación. En las células de mamífero, la caspasa iniciadora clave (caspasa-9) es activada mediante la unión de Apaf-1 a un complejo multisubunidad denominado **apoptosoma** (Fig. 17.5). La formación de este complejo en mamíferos también requiere al citocromo *c*, que es liberado de las mitocondrias por estímulos que desencadenan la apoptosis (analizado en la siguiente sección). Una vez activado el apoptosoma, la caspasa-9 escinde y activa a las caspasas efectoras, como la caspasa-3 y caspasa-7, resultando finalmente en la muerte celular.

Reguladores centrales de la apoptosis: La familia Bcl-2

El tercer gen identificado como un regulador clave de la muerte celular programada en *C. elegans*, *ced-9*, se encontró que estaba estrechamente relacio-

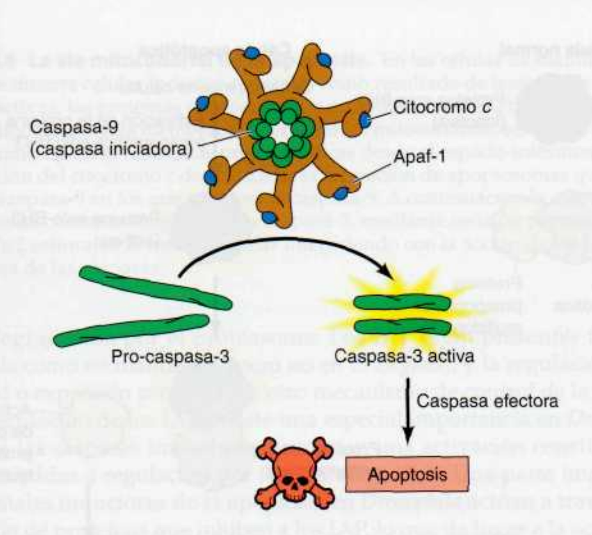


Figura 17.5 Activación de las caspasas. El iniciador de mamíferos caspasa-9 se activa formando un complejo con Apaf-1 y el citocromo *c* en el apoptosoma. La caspasa-9 a continuación escinde y activa a las caspasas efectoras, como las caspasa-3.

nado con un gen mamífero denominado *bcl-2*, que fue identificado por primera vez en 1985 como un oncogén que contribuía al desarrollo de los linfomas de células B humanas (cánceres de los linfocitos B). Al contrario que otras proteínas oncogénicas, como Ras, que estimulan la proliferación celular (véase Medicina Molecular, Cap. 15), se descubrió que **Bcl-2** inhibía la apoptosis. Ced-9 y Bcl-2 eran por tanto similares en cuanto a función, y el papel de Bcl-2 como regulador de la apoptosis centró primero la atención sobre la importancia de la supervivencia celular en el desarrollo del cáncer. *Como se analizará en el capítulo siguiente, ahora reconocemos que las células* cancerosas son generalmente deficientes en el proceso normal de muerte celular programada, y que su incapacidad para sufrir apoptosis es tan importante como su proliferación descontrolada durante el desarrollo de tumores malignos.

Los mamíferos codifican una familia de aproximadamente 20 proteínas relacionadas con Bcl-2, que se dividen en tres grupos funcionales (Fig. 17.6). Algunos miembros de la familia Bcl-2 (miembros antiapoptóticos de la familia) —como el propio Bcl-2— funcionan como inhibidores de la apoptosis y la muerte celular programada. Otros miembros de la familia Bcl-2, sin embargo, son proteínas proapoptóticas que actúan para inducir la activación de las caspasas y estimular la muerte celular programada. Existen dos grupos de dichas proteínas proapoptóticas, que difieren en su función además de en la extensión de su homología con Bcl-2. Bcl-2 y otros miembros antiapoptóticos de la familia comparten cuatro regiones conservadas denominadas dominios de homología con Bcl-2 (BH). Un grupo de miembros pro-apoptóticos de la familia denominadas las proteínas proapoptóticas «multidominio» poseen 3 dominios BH (BH1, BH2 y BH3), mientras que el segundo grupo, las proteínas «solo-BH3», solamente poseen el dominio BH3.

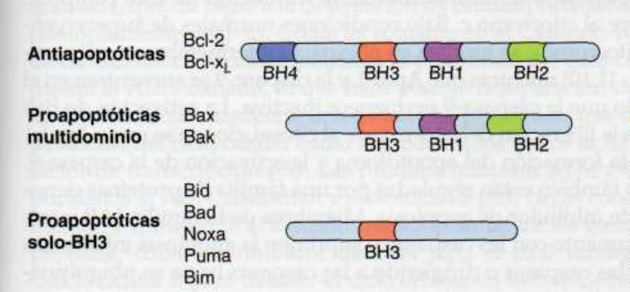


Figura 17.6 La familia Bcl-2. La familia de proteínas Bcl-2 se divide en tres grupos funcionales. Las proteínas antiapoptóticas (p. ej., Bcl-2 y Bcl-x_L) poseen cuatro dominios de homología a Bcl-2 (BH1-BH4). Las proteínas proapoptóticas multidominio (p. ej., Bax y Bak) poseen tres dominios de homología (BH1-BH3), mientras que las proteínas proapoptóticas solo-BH3 (p. ej., Bid, Bad, Noxa, Puma y Bim) sólo poseen un dominio de homología (BH3).

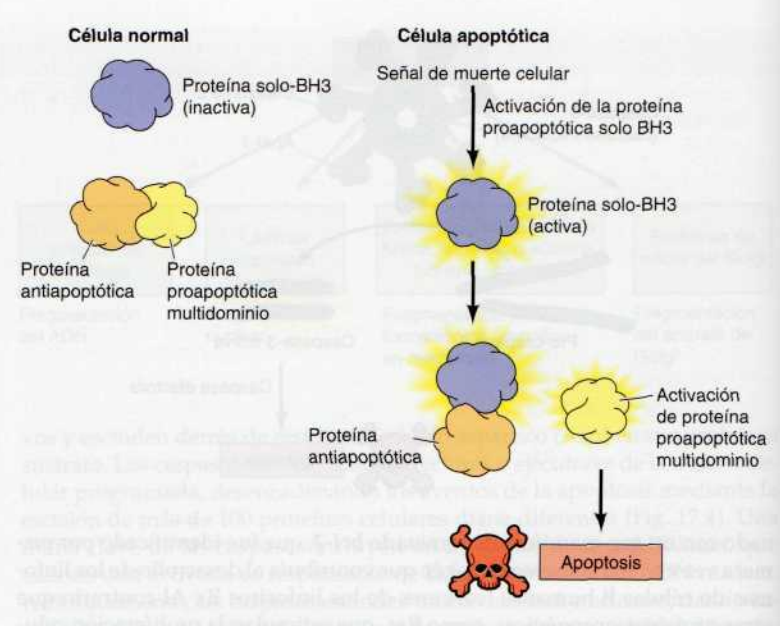


Figura 17.7 Interacciones reguladoras entre miembros de la familia Bcl-2. En las células normales, las proteínas proapoptóticas solo-BH3 están inactivas, y las proteínas proapoptóticas multidominio están inhibidas mediante su interacción con las proteínas antiapoptóticas. Las señales de muerte celular activan a las proteínas solo-BH3, que a continuación interaccionan con las proteínas antiapoptóticas, desencadenando la activación de las proteínas proapoptóticas multidominio y la muerte celular.

El destino de la célula —la vida o la muerte— está determinada por el equilibrio de la actividad proapoptótica y antiapoptótica de los miembros de la familia Bcl-2, que actúan para regularse entre ellos (Fig. 17.7). Los miembros proapoptóticos multidominio de la familia, como Bax y Bak, son efectores corriente abajo que inducen directamente la apoptosis. Son inhibidos por interacciones con los miembros antiapoptóticos de la familia, como Bcl-2. Los miembros solo-BH3 de la familia se encuentran corriente arriba de la cascada, y se encuentran regulados mediante señales que inducen la muerte celular (p. ej., lesiones en el ADN) o la supervivencia celular (p. ej., los factores de crecimiento). Una vez activados, los miembros solo-BH3 de la familia antagonizan a los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, activando a las proteínas proapoptóticas multidominio y desplazando el equilibrio hacia la activación de las caspasas y la muerte celular.

17.2 Animación web

Vía mitocondrial de la apoptosis

Muchos tipos de estrés celular activan la vía intrínseca de la apoptosis –una vía que provoca la liberación del citocromo *c* por las mitocondrias, la activación de la caspasa-9 y, consecuentemente, la muerte de la célula.

En las células de mamífero, los miembros de la familia Bcl-2 actúan en las mitocondrias, que juegan un papel central en el control de la muerte celular programada (Fig. 17.8). Una vez activados, Bax y Bak forman oligómeros en la membrana mitocondrial externa. La formación de estos oligómeros de Bax o Bak desencadena la liberación del citocromo *c* del espacio intermembrana mitocondrial, mediante la formación de poros o mediante la interacción con otras proteínas de la membrana externa mitocondrial. La liberación del citocromo *c* desde las mitocondrias desencadena la activación de las caspasas. En particular, la caspasa iniciadora clave en las células de mamífero (caspasa-9) es activada mediante la formación de un complejo con Apaf-1 en el apoptosoma. En mamíferos, la formación de este complejo también requiere al citocromo *c*. Bajo condiciones normales de supervivencia celular, el citocromo *c* se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial (véase Fig. 11.10) mientras que Apaf-1 y la caspasa-9 se encuentran en el citosol, de modo que la caspasa-9 permanece inactiva. La activación de Bax o Bak resulta en la liberación del citocromo *c* al citosol, donde se une a Apaf-1 y desencadena la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-9.

■ **Las IAPs fueron descubiertas en primer lugar en células de insecto infectadas por virus como proteínas víricas que inhiben la apoptosis de una célula hospedadora.**

Las caspasas también están reguladas por una familia de proteínas denominadas **IAP**, de *i*nhibidor de *ap*optosis. Miembros de la familia IAP interaccionan directamente con las caspasas y suprimen la apoptosis inhibiendo la actividad de las caspasas o dirigiendo a las caspasas hacia su ubiquitina-

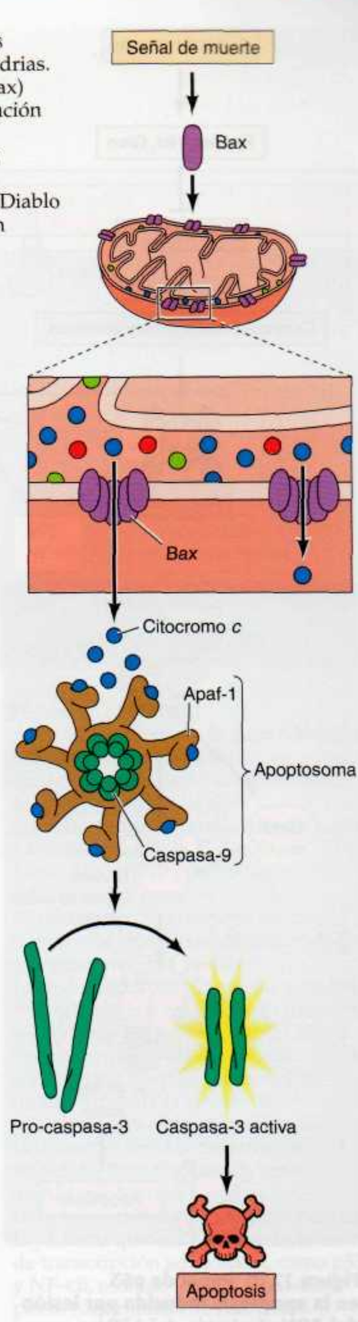


Figura 17.8 La vía mitocondrial de la apoptosis. En las células de mamífero, muchas señales de muerte celular inducen apoptosis como resultado de lesiones de las mitocondrias. Una vez activas, las proteínas proapoptóticas multidominio de la familia Bcl-2 (p. ej., Bax) forman oligómeros en la membrana externa de las mitocondrias, resultando en la liberación del citocromo *c* y otras moléculas proapoptóticas desde el espacio intermembrana. La liberación del citocromo *c* desencadena la formación de apoptosomas que contienen Apaf-1 y caspasa-9 en los que se activa la caspasa-9. A continuación la caspasa-9 activa a las caspasas corriente abajo, como la caspasa-3, mediante escisión proteolítica. Smac/Diablo y Omi/Htr2 estimulan la muerte celular interfiriendo con la acción de las IAPs, que son inhibidores de las caspasas.

ción y degradación por el proteasoma. Los IAP están presentes tanto en *Drosophila* como en mamíferos (pero no en *C. elegans*), y la regulación de su actividad o expresión proporciona otro mecanismo de control de la apoptosis. La regulación de los IAP reviste una especial importancia en *Drosophila*, en la que las caspasas iniciadoras presentan una activación constitutiva y están sometidas a regulación por los IAP (Fig. 17.9). Una parte importante de las señales inductoras de la apoptosis en *Drosophila* actúan a través de la activación de proteínas que inhiben a los IAP, lo que da lugar a la activación de caspasas. En las células de mamífero, la permeabilización de las mitocondrias por Bax o Bak no solamente provoca la liberación del citocromo *c*, sino también de inhibidores de los IAP que pueden estimular la actividad de las caspasas.

Vías de señalización que regulan la apoptosis

La actividad integrada de diversas vías de señalización, algunas de las cuales inducen la muerte celular y otras lo hacen para favorecer la supervivencia celular, regulan la muerte celular programada. Estas señales controlan el destino de las células individuales, de modo que la supervivencia celular o la eliminación se ven determinadas por las necesidades del organismo completo. Las vías que inducen la apoptosis en las células de mamífero se clasifican como *intrínsecas* o *extrínsecas* en función de la implicación de las proteínas de la familia Bcl-2 y la identidad de la caspasa que ponga en marcha la muerte celular.

Un papel importante de la apoptosis es la eliminación de células dañadas, de modo que diversos tipos de estrés celular, como daños al ADN, infecciones virales y agotamiento de factores de crecimiento, inducen la apoptosis. Estos estímulos activan la vía intrínseca de la apoptosis, lo que induce la liberación del citocromo *c* por las mitocondrias y la activación de la caspasa-9 (véase Fig. 17.8). Como se muestra en los ejemplos que aparecen a continuación, las diversas señales que activan esta vía convergen en la regulación de los miembros BH3 de la familia Bcl-2.

El ADN dañado representa una de las formas más peligrosas de estrés celular, ya que las células con genomas dañados pueden portar mutaciones que pueden desencadenar el desarrollo de un cáncer. Por tanto, los daños al ADN son uno de los principales desencadenantes de la muerte celular programada, que da lugar a la destrucción de células portadoras de mutaciones potencialmente nocivas. Como se comenta en el Capítulo 16, varios puntos de control del ciclo celular detienen la progresión del ciclo celular como respuesta al ADN dañado, lo que hace posible la reparación de estas lesiones. En las células de mamífero, una de las vías principales que desencadenan la detención del ciclo celular como respuesta a los daños al ADN depende del factor de transcripción **p53**. Las proteína quinasas ATM y Chk2, activadas por daños al ADN, fosforilan y estabilizan a p53, cuyas concentraciones aumentan e inducen la activación transcripcional de los genes diana de esta proteína, como el inhibidor de Cdk p21, el cual inhibe los complejos Cdk2/ciclina E para detener el ciclo celular en la fase G_1 (véase Fig. 16.20).

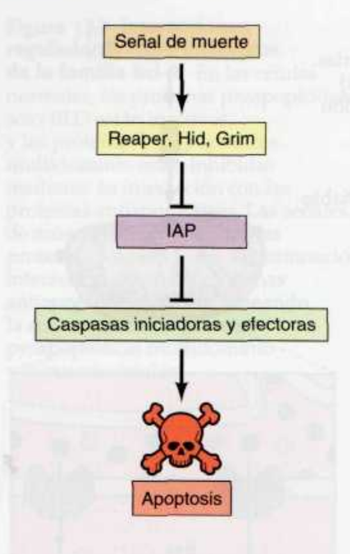


Figura 17.9 Regulación de las caspasas por los IAP en *Drosophila*. Los IAP inhiben tanto a las caspasas iniciadoras como a las efectoras. Muchas señales que inducen la apoptosis en *Drosophila* actúan a través de la activación de miembros de una familia de proteínas (Reaper, Hid y Grim) que inhiben a los IAP y conducen a la activación de las caspasas.

No obstante, la activación de p53 por el ADN dañado también induce la apoptosis (Fig. 17.10). La inducción de la apoptosis por p53 se debe, al menos en parte, a la activación transcripcional de genes que codifican a los miembros PUMA y Noxa de la familia Bcl-2 proapotótica solo-BH3. El aumento de la expresión de estas proteínas solo-BH3 conduce a la activación de Bax y Bak, la liberación del citocromo *c* por las mitocondrias, y la activación de la caspasa-9. Por tanto, p53 interviene tanto en la parada del ciclo celular como en la apoptosis como respuesta a daños en el ADN. Si el ADN lesionado en una célula determinada da lugar a la apoptosis o a una detención reversible del ciclo celular puede depender del grado de la lesión y el nivel de inducción resultante de p53, además de la influencia de otras señales de vida/muerte que reciba la célula.

El agotamiento de los factores de crecimiento se considera otra forma de estrés celular que activa la vía intrínseca de la apoptosis. En este caso, la apoptosis depende de vías de señalización que favorecen la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis como respuesta a la estimulación por factores de crecimiento. Estas vías controlan el destino de un amplio abanico de células cuya supervivencia depende de factores de crecimiento extracelulares o bien de interacciones intercelulares. Como se ha indicado anteriormente, el sistema nervioso central de los vertebrados constituye un ejemplo bien caracterizado de la muerte celular programada en el desarrollo. Alrededor del 50% de las neuronas muere debido a apoptosis y las células supervivientes han recibido cantidades suficientes de señales de supervivencia de sus células diana. Estas señales son factores de crecimiento polipeptídicos relacionados con el factor de crecimiento nervioso (NGF), el cual induce tanto la supervivencia como la diferenciación de las neuronas a través de la activación de una proteína tirosina quinasa de receptores. Otros tipos celulares también dependen de factores de crecimiento o contactos intercelulares que activan a proteína tirosina quinasas no de receptores asociadas a las integrinas. En efecto, la mayoría de las células de los animales superiores están programadas para sufrir apoptosis a no ser que se inhiba de manera activa la muerte celular por señales de supervivencia procedentes de otras células.

Una de las principales vías de señalización responsable de estimular la muerte celular es iniciado por la enzima **PI 3-quinasa**, que es activada por proteína-tirosina quinasas o receptores acoplados a proteínas G. La PI 3-quinasa fosforila al fosfolípido de membrana PIP_2 para formar PIP_3, que activa la proteína-serina/treonina quinasa **Akt** (véanse Figs. 15.30 y 15.31). A continuación, Akt fosforila a un número de proteínas que regulan la apoptosis (Fig. 17.11). Un sustrato clave de Akt es el miembro de la familia Bcl-2 proapoptótico solo-BH3, denominado Bad. La fosforilación de Bad por Akt crea un sitio de unión para las proteínas chaperonas 14-3-3 que secuestran a Bad en una forma inactiva, de modo que la fosforilación de Bad por Akt inhibe la apoptosis y favorece la supervivencia celular. Bad es fosforilado de forma similar por proteínas quinasas de otras vías de señalización activadas por factores de crecimiento, incluyendo la vía Ras/Raf/MEK/ERK, de forma que sirve como regulador convergente de la señalización desde factores de crecimiento en la mediación de la supervivencia celular.

Otras dianas de Akt, incluidos los factores de transcripción FOXO, también juegan papeles clave en la supervivencia celular. La fosforilación de FOXO por Akt crea un sitio de unión para proteínas 14-3-3, que secuestran a

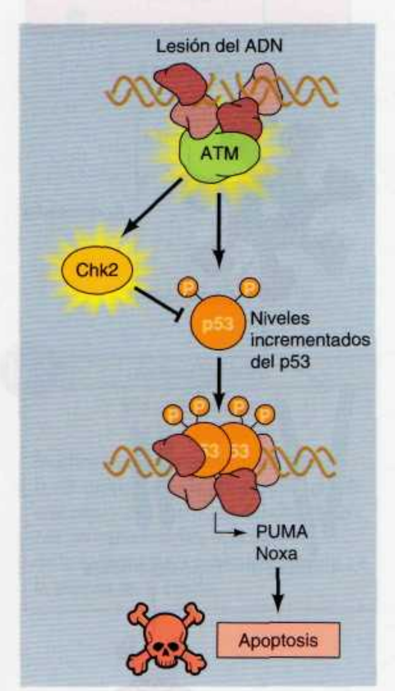
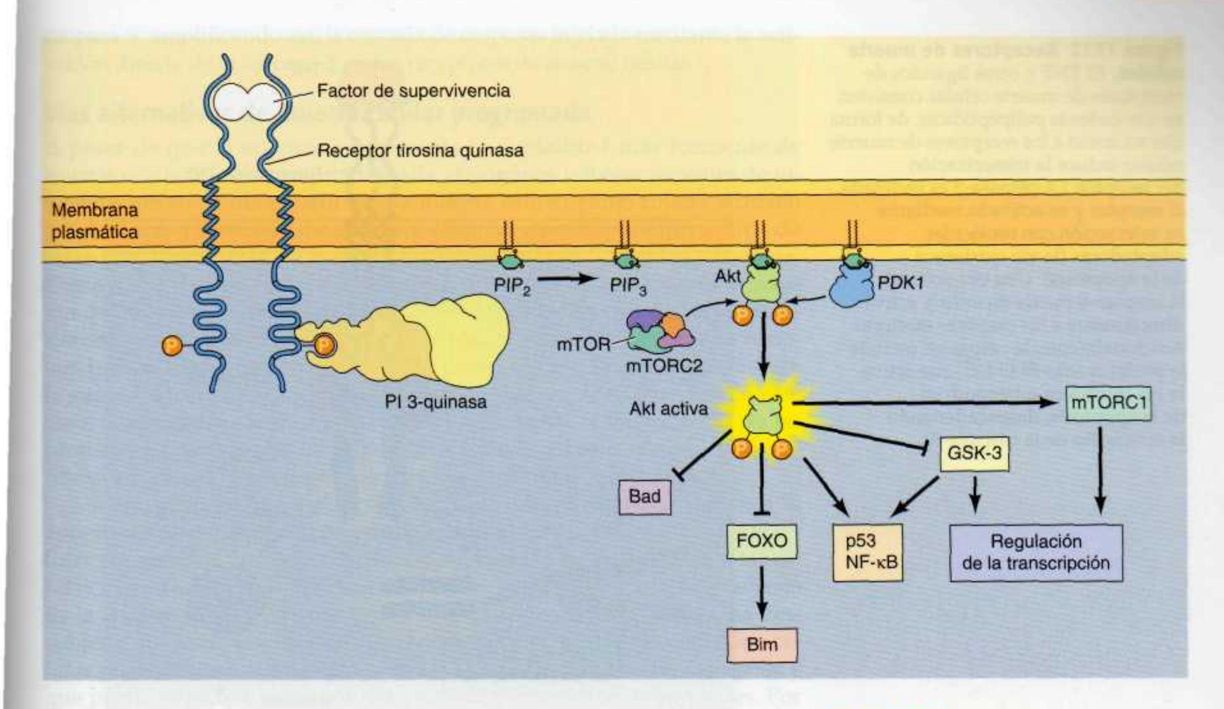


Figura 17.10 Papel de p53 en la apoptosis inducida por lesión del ADN. La lesión del ADN desencadena la activación de las proteínas quinasas ATM y Chk2 proteínas quinasas, que fosforilan y estabilizan a p53, lo que resulta en un incremento rápido de los niveles de p53. A continuación, la proteína p53 activa la transcripción de genes que codifican las proteínas proapoptóticas solo-BH3 PUMA y Noxa, dando lugar a la muerte celular.



FOXO en una conformación inactiva en el citoplasma (véase Fig. 15.32). En ausencia de la señalización por factores de crecimiento y de la actividad Akt, FOXO es liberado de 14-3-3 y se transloca al núcleo, estimulando la transcripción de genes proapoptóticos, incluyendo el gen que codifica la proteína solo-BH3, Bim. Akt y su diana corriente abajo GSK-3 también regulan otros factores de transcripción con papeles en la supervivencia celular, incluyendo p53 y NF-κB, que pueden controlar la expresión de otros miembros de la familia Bcl-2. Por otra parte, el nivel de un miembro antiapoptótico de esta familia puede ser modulado mediante regulación transcripcional a través de las vías de GSK-3 y mTOR (véase Fig. 15.33). En la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis confluyen estos efectos múltiples en varios miembros de la familia Bcl-2, que controlan la activación de la caspasa-9 y la supervivencia celular como respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.

A diferencia de las vías de señalización del estrés celular y las mediadas por factores de crecimiento que controlan la vía intrínseca de la apoptosis, algunos polipéptidos secretados activan a receptores que inducen la muerte celular a través de la vía extrínseca de la apoptosis. Estos receptores activan directamente una caspasa iniciadora, la caspasa-8 (Fig. 17.12). Los polipéptidos que actúan para señalizar la muerte celular en esta vía pertenecen a la familia del **factor de necrosis tumoral (FNT)**. Se unen a miembros de la familia de receptores TNF, que pueden señalizar la apoptosis en una diversidad de tipos celulares. Uno de los miembros mejor caracterizados de esta familia es el receptor de superficie Fas, que juega papeles importantes en el control de la muerte celular en el sistema inmune. Por ejemplo, la apoptosis inducida por activación de Fas es responsable de la muerte de células diana del sistema inmune, como las células cancerosas o infectadas por virus, además de la eliminación del exceso de linfocitos al final de una respuesta inmune.

El TNF y los miembros de la familia relacionados consisten en tres cadenas polipeptídicas idénticas, y su unión induce la trimerización del receptor. Las porciones citoplásmicas de los receptores se unen a moléculas adaptadoras que a su vez se unen a una caspasa iniciadora denominada caspasa-8.

Figura 17.11 La vía de la PI 3-quinasa y la supervivencia celular. Muchos factores de crecimiento que señalizan la supervivencia celular activan receptores de tipo proteína-tirosina quinasa, dando lugar a la activación de la PI 3-quinasa, formación de PIP_3, y activación de la proteína quinasa, Akt. A continuación, Akt fosforila un cierto número de proteínas que contribuyen a la supervivencia celular. La fosforilación de la proteína solo-BH3 Bad la mantiene en un estado inactivo, al igual que la fosforilación del factor de transcripción FOXO. En ausencia de señalización por Akt, la activación de Bad estimula la apoptosis, y la activación de FOXO estimula la transcripción de otra proteína solo-BH3, Bim. Dianas adicionales de Akt que han sido implicadas en la regulación de la apoptosis incluyen la proteína quinasa GSK-3 y factores de transcripción adicionales, como p53 y NF-κB, estando los dos regulados por la fosforilación de Akt y GSK-3. La regulación de la traducción por GSK-3 y por la vía mTOR (véase Fig. 15.33) también podría afectar a la supervivencia celular.

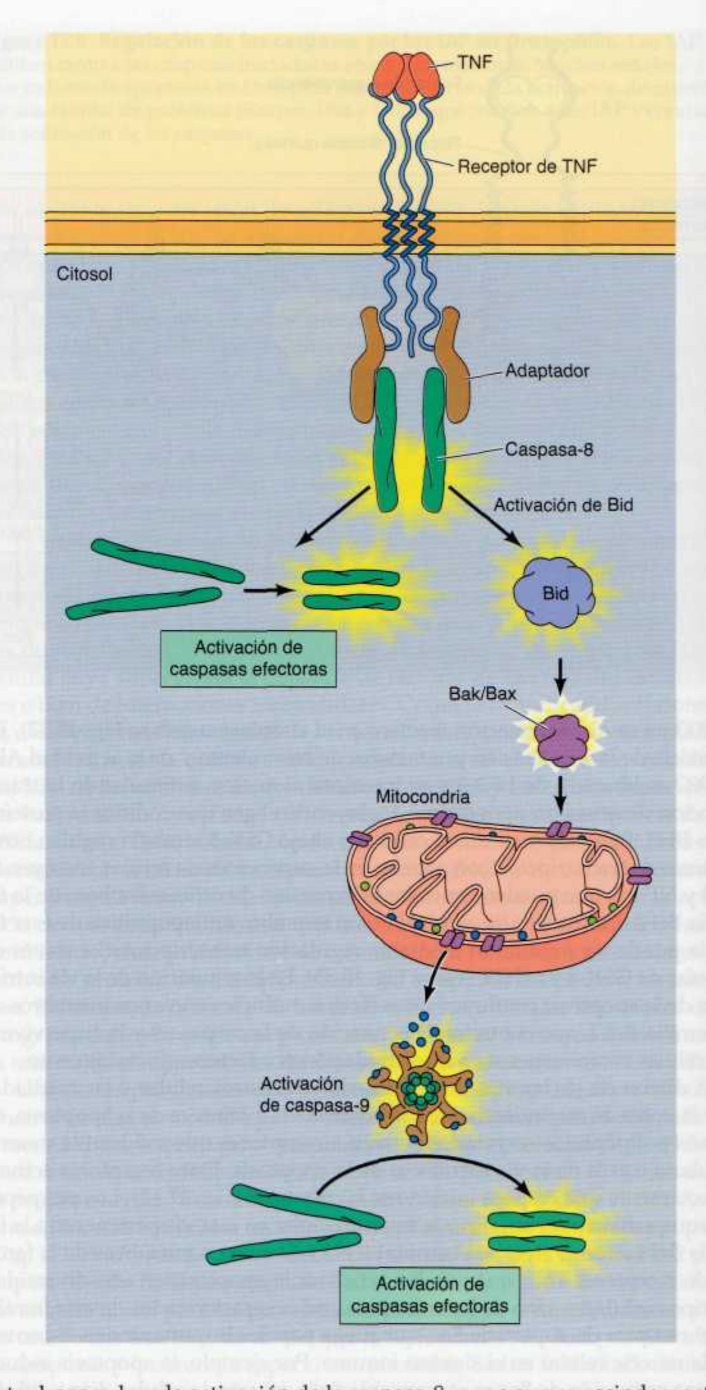


Figura 17.12 Receptores de muerte celular. El TNF y otros ligandos de receptores de muerte celular consisten en tres cadenas polipeptídicas, de forma que su unión a los receptores de muerte celular induce la trimerización del receptor. La caspasa-8 es reclutada al receptor y es activada mediante su interacción con moléculas adaptadoras (la vía extrínseca de la apoptosis). Una vez activada, la caspasa-8 puede escindir y activar directamente a las caspasas efectoras. Adicionalmente, la caspasa-8 escinde la proteína solo-BH3 Bid, que activa la vía intrínseca mitocondrial de la apoptosis, desencadenando la activación de la caspasa-9.

Las terapias basadas en un miembro de la familia TNF se encuentra bajo ensayos clínicos para el tratamiento de determinados cánceres.

Esto desencadena la activación de la caspasa-8, que a su vez escinde y activa a caspasas efectoras corriente abajo. En algunas células, la activación de la caspasa-8 y la consiguiente activación de las caspasas-3 y -7 es suficiente para inducir directamente la apoptosis. En otras células, sin embargo, es necesaria la amplificación de la señal. Esto resulta de la escisión por parte de la caspasa-8 de la proteína proapoptótica solo-BH3 Bid, dando lugar a la activación de Bid, la permeabilización de las mitocondrias y la activación de la

caspasa-9, amplificando así, la cascada de caspasas iniciada mediante la activación directa de la caspasa-8 en los receptores de muerte celular.

Vías alternativas de muerte celular programada

A pesar de que la apoptosis representa la modalidad más frecuente de muerte celular regulada o programada, en algunos trabajos recientes de investigación se ha observado que la muerte celular programada también puede darse a través de mecanismos alternativos no apoptóticos. Una de estas vías alternativas de muerte celular regulada se denomina **autofagia**. Como se ha señalado en el Capítulo 8, la autofagia representa un mecanismo de recambio gradual de los componentes celulares basado en la captación de proteínas u orgánulos por vesículas (autofagosomas) que se fusionan con los lisosomas (véase Fig. 8.45). Por otra parte, la autofagia favorece la supervivencia celular en condiciones de escasez de nutrientes. En este caso, la activación de dicho mecanismo incrementa la degradación de las proteínas y los orgánulos celulares, de forma que se genera energía y se reutilizan sus constituyentes para llevar a cabo funciones esenciales.

Sin embargo, la autofagia representa un mecanismo alternativo a la apoptosis como vía de muerte celular en otras circunstancias. La muerte celular por autofagia no depende de la participación de las caspasas y las células moribundas, en lugar de mostrar los rasgos morfológicos peculiares de la apoptosis, se distinguen por la acumulación de lisosomas. Se ha descubierto que la autofagia constituye un mecanismo destacado de muerte celular programada en el desarrollo de las glándulas salivales de *Drosophila* y que puede inducirse como consecuencia de ciertas infecciones virales. Por otra parte, la autofagia parece ser una vía alternativa de muerte celular en caso de inhibición de la apoptosis. Por ejemplo, las células de ratones mutantes que carecen de Bak y Bax no pueden someterse a apoptosis como respuesta a estímulos como daños del ADN, como cabría esperar dado que ambas proteínas están implicadas en la permeabilización de las mitocondrias (véase Fig. 17.8). No obstante, las células deficientes en Bak/Bax sí pueden destruirse mediante autofagia, lo que indica que también se activaría como consecuencia del estrés celular y sería una alternativa a la apoptosis en estas condiciones.

De igual modo, se cree que algunos tipos de necrosis constituyen una respuesta celular programada en mayor medida que un sencillo proceso de lisis celular incontrolada inducido por una lesión aguda. A diferencia de la necrosis incontrolada, estas formas de muerte celular necrótica regulada son una respuesta programada inducida por estímulos como una infección o daños al ADN, que también desencadenan la apoptosis. En estas condiciones, la necrosis regulada puede actuar como un mecanismo alternativo de muerte celular en ausencia de apoptosis. Por ejemplo, la estimulación del receptor de TNF conduce a la muerte celular por necrosis cuando la apoptosis está inhibida. No se conoce bien cuáles serían las importancias relativas de la autofagia y la necrosis como vías alternativas a la apoptosis tanto en células normales como en estados patológicos como el cáncer, las cardiopatías y la neurodegeneración, en las que intervienen diversas anomalías de la supervivencia celular.

Células madre y mantenimiento de los tejidos adultos

El desarrollo temprano se caracteriza por la rápida proliferación de las células embrionarias, que después se diferencian para formar las células especializadas de los tejidos y órganos adultos. A medida que las células se diferencian, su tasa de proliferación generalmente disminuye, y la mayoría de las células en los animales adultos se encuentran detenidas en la fase G_0 del ci-

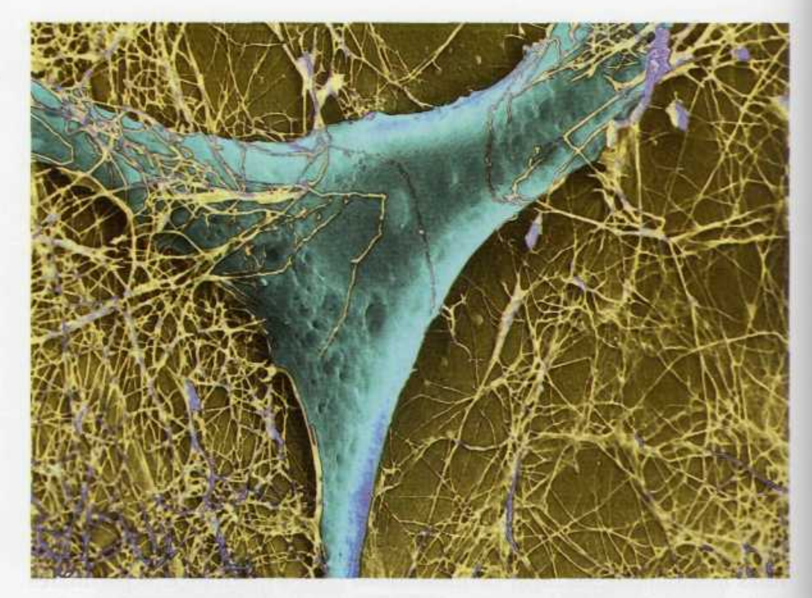


Figura 17.13 Fibroblastos de la piel. Micrografía electrónica de barrido de un fibroblasto rodeado de fibrillas de colágeno (© CMEABG-UCBL/Photo Researchers Inc.)

clo celular. Sin embargo, las células se pierden debido a lesiones o a la muerte celular programada a lo largo de la vida. Para mantener un número constante de células en los tejidos y órganos adultos, la muerte celular debe estar equilibrada con la proliferación celular. Para mantener este equilibrio, la mayoría de los tejidos contienen células que son capaces de proliferar a medida que sea necesario para reemplazar a las células que han muerto. Además, en algunos tejidos una subpoblación celular se divide continuamente a lo largo de la vida para reemplazar las células que poseen una elevada tasa de renovación en los animales adultos. La muerte celular y la renovación celular están, por tanto, cuidadosamente equilibradas para mantener los tejidos y órganos adultos funcionales y con su tamaño apropiado.

Proliferación de células diferenciadas

La mayoría de los tipos de células diferenciadas en los animales adultos no son capaces de proliferar. Si estas células se pierden, son reemplazadas por la proliferación de células menos diferenciadas derivadas de las células madre autorrenovables, como se describe en la siguiente sección. Otros tipos de células diferenciadas, sin embargo, mantienen la capacidad de proliferar a medida que es necesario reparar el tejido dañado a lo largo de la vida del organismo. Estas células entran en la fase G_0 del ciclo celular pero reanudan la proliferación cuando es necesario para sustituir células dañadas o muertas.

Las células de este tipo incluyen a los fibroblastos, que están dispersos en los tejidos conectivos donde secretan colágeno (Fig. 17.13). Los fibroblastos de la piel normalmente se encuentran detenidos en la fase G_0 pero rápidamente proliferan, si es necesario, para reparar lesiones resultantes de un corte o una herida. La coagulación sanguínea en el lugar de una lesión da lugar a la liberación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) por parte de las plaquetas sanguíneas. Como se describió en el Capítulo 15, el PDGF activa a un receptor proteína-tirosina quinasa, estimulando tanto la proliferación de fibroblastos y su migración hacia el interior de la herida donde su proliferación y secreción de colágeno contribuye a la reparación y cicatrización del tejido dañado.

Las células endoteliales que revisten el interior de los vasos sanguíneos (Fig. 17.14) son otro tipo de célula totalmente diferenciada que retiene la ca-

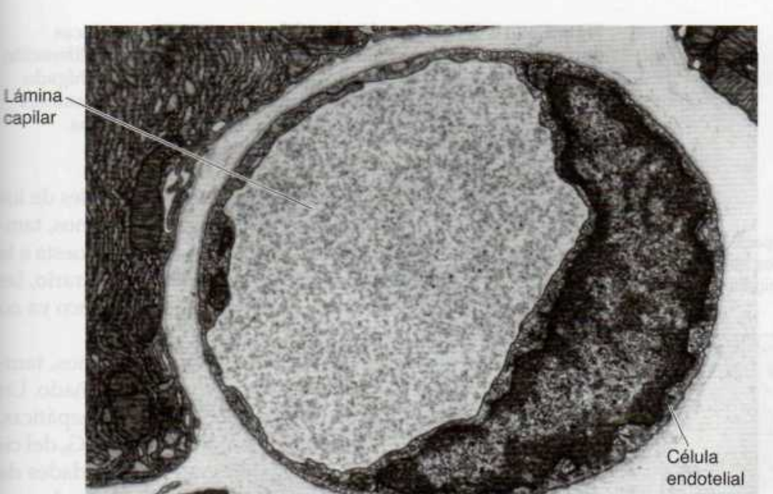


Figura 17.14 Células endoteliales. Micrografía electrónica de un capilar. El capilar está revestido por una sola célula endotelial rodeada por una fina lámina basal. (© Dr. Don W. Fawcett/Visuals Unlimited.)

pacidad de proliferación. La proliferación de las células endoteliales les permite formar nuevos vasos sanguíneos a medida que son necesarios para la reparación y reformación de tejidos dañados. La proliferación de células endoteliales y la formación resultante que los nuevos capilares sanguíneos está desencadenada por un factor de crecimiento (el factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF) producido por las células del tejido, que será invadido por los nuevos capilares. La producción de VEGF es, a su vez, desencadenado por la falta de oxígeno, de forma que el resultado es un sistema regulador en el que los tejidos que poseen un suministro de oxígeno bajo como resultado de una circulación insuficiente estimulan la proliferación de las células endoteliales y reclutan nuevos capilares (Fig. 17.15). Las células de músculo liso, que forman las paredes de los vasos sanguíneos mayores

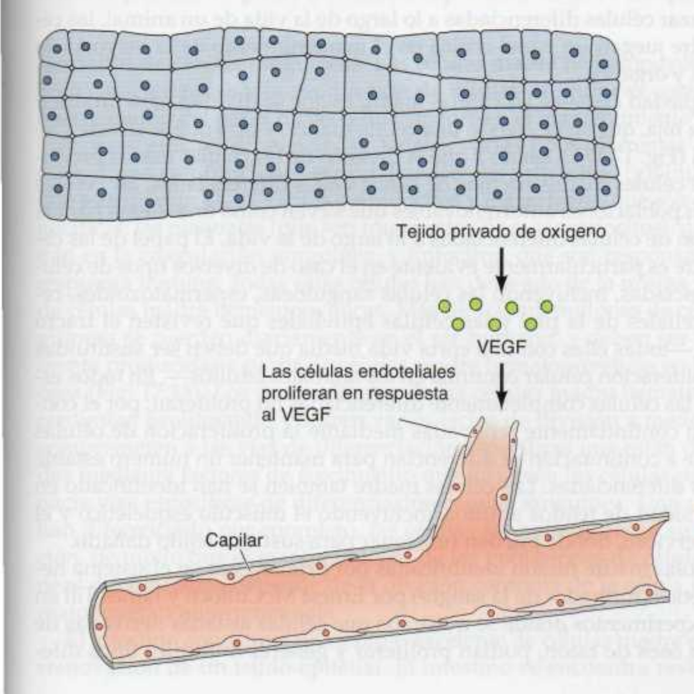


Figura 17.15 Proliferación de células endoteliales. Las células endoteliales son estimuladas para proliferar por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El VEGF es secretado por células privadas de oxígeno, dando lugar al crecimiento de nuevos capilares hacia tejidos que carecen de un suministro sanguíneo adecuado.

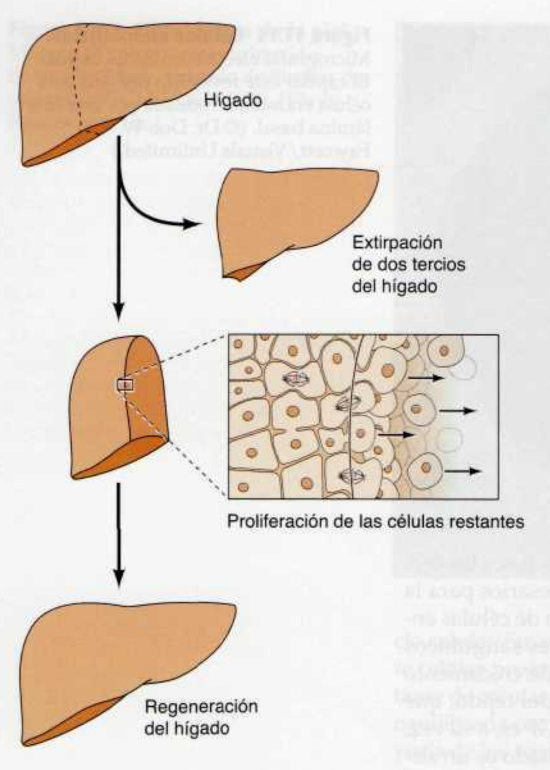


Figura 17.16 Regeneración hepática. Las células hepáticas normalmente están detenidas en G_0 pero reanudan la proliferación para reemplazar tejido dañado. Si dos terceras partes del hígado de una rata son extirpadas quirúrgicamente, las células restantes proliferan para regenerar el hígado completo en pocos días.

(p. ej., las arterias) además de las porciones contráctiles de los tractos digestivo y respiratorio y otros órganos internos, también son capaces de reanudar la proliferación en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento. Por el contrario, las células diferenciadas de músculo esquelético o cardíaco ya no son capaces de dividirse.

Las células epiteliales de algunos órganos internos, también son capaces de proliferar y reemplazar tejido dañado. Un ejemplo llamativo es proporcionado por las células hepáticas, que normalmente se encuentran detenidas en la fase G_0 del ciclo celular. Sin embargo, si se pierden grandes cantidades de células hepáticas (p. ej., mediante resección quirúrgica de parte del hígado), las células restantes son estimuladas para proliferar y reemplazar el tejido que falta (Fig. 17.16). Por ejemplo, la resección quirúrgica de dos terceras partes del hígado de una rata es seguido de una rápida proliferación de las células restantes, dando lugar a la regeneración del hígado completo en pocos días.

Células madre

La mayoría de las células completamente diferenciadas en los animales adultos, sin embargo, ya no poseen la capacidad de división celular. No obstante, pueden ser sustituidas por la proliferación de una subpoblación de células autorrenovables menos diferenciadas denominadas **células madre**, que están presentes en la mayoría de los tejidos adultos. Puesto que mantienen su capacidad de proliferar y reemplazar células diferenciadas a lo largo de la vida de un animal, las células madre juegan un papel crítico en el mantenimiento de la mayoría de los tejidos y órganos.

La propiedad clave de las células madre es que se dividen para producir una célula hija, que sigue siendo una célula madre, y otra que se divide y se diferencia (Fig. 17.17). Debido a que la división de las células madre produce nuevas células madre además de células hijas diferenciadas, las células madre son poblaciones autorrenovables que sirven como una fuente para la producción de células diferenciadas a lo largo de la vida. El papel de las células madre es particularmente evidente en el caso de diversos tipos de células diferenciadas, incluyendo las células sanguíneas, espermatozoides, células epiteliales de la piel y las células epiteliales que revisten el tracto digestivo —todas ellas con una corta vida media que deben ser sustituidas por la proliferación celular continua en los animales adultos—. En todos estos casos, las células completamente diferenciadas no proliferan; por el contrario, son continuamente renovadas mediante la proliferación de células madre que a continuación se diferencian para mantener un número estable de células diferenciadas. Las células madre también se han identificado en una diversidad de tejidos adultos, incluyendo el músculo esquelético y el sistema nervioso, donde pueden funcionar para sustituir tejido dañado.

Las células madre fueron identificadas por primera vez en el sistema hematopoyético (formador de la sangre) por Ernest McCulloch y James Till en 1961 en experimentos donde se mostraba que células aisladas derivadas de la médula ósea de ratón, podían proliferar y generar múltiples tipos dife-

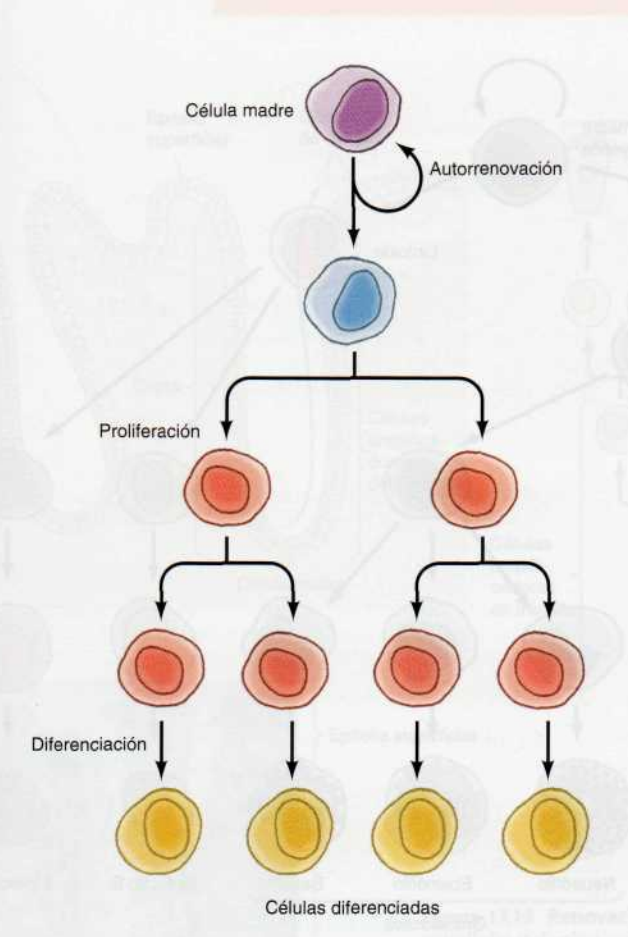


Figura 17.17 Proliferación de células madre. Las células madre se dividen para formar una célula hija que sigue siendo una célula madre, y una segunda que prolifera y después se diferencia.

renciados de células sanguíneas. Las células madre hematopoyéticas están bien caracterizadas y la producción de células sanguíneas constituye un buen ejemplo del papel de las células madre en el mantenimiento de las poblaciones celulares diferenciadas. Existen varios tipos diferentes de células sanguíneas con funciones especializadas: los eritrocitos (glóbulos rojos), que transportan O_2 y CO_2; los granulocitos y macrófagos, que son células fagocíticas; las plaquetas (que son fragmentos de megacariocitos), que funcionan en la coagulación sanguínea, y linfocitos, que son responsables de la respuesta inmune. Todas estas células han derivado de la misma población de células madre hematopoyéticas. Más de 100 mil millones de células sanguíneas se pierden diariamente en el ser humano, y deben ser continuamente producidas a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea (Fig. 17.18). Los descendientes de las células madre hematopoyéticas continúan proliferando y sufren varios ciclos de división a medida que se comprometen a las vías de diferenciación específicas que están determinadas mediante factores de crecimiento que dirigen a las células precursoras hacia vías específicas de diferenciación celular sanguínea. Una vez que se han diferenciado por completo, las células sanguíneas cesan su proliferación, de modo que el mantenimiento de las poblaciones de células sanguíneas diferenciadas depende de la división continua de la célula madre hematopoyética autorrenovable.

El intestino constituye un ejemplo excelente de células madre en la autorrenovación de un tejido epitelial. El intestino se encuentra revestido por

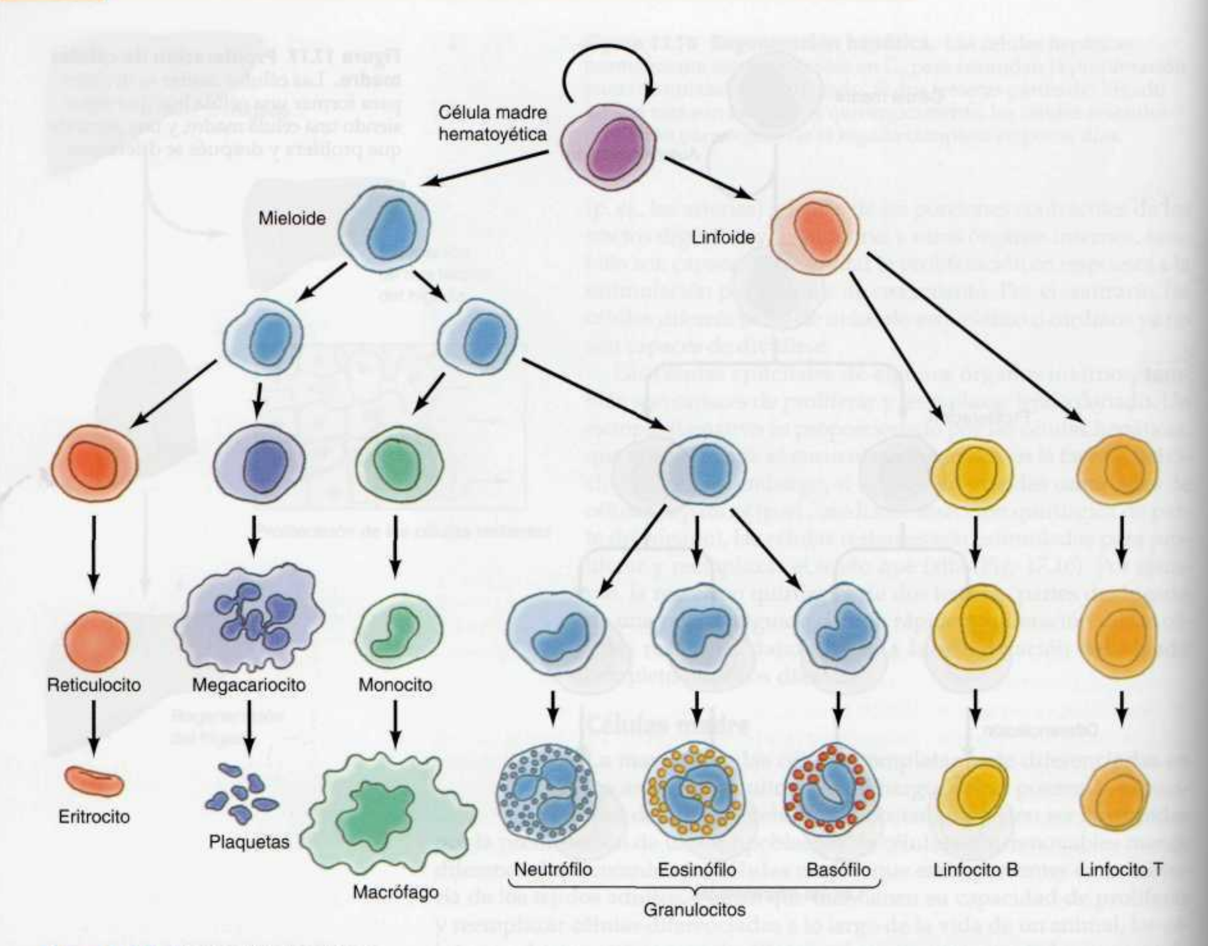


Figura 17.18 Formación de células sanguíneas. Todos los diferentes tipos de células sanguíneas se desarrollan a partir de una célula madre hematopoyética en la médula ósea. Los precursores de las células diferenciadas sufren varios ciclos de división antes de diferenciarse.

una sola capa de células epiteliales que son responsables de la digestión del alimento y la absorción de nutrientes. Estas células epiteliales intestinales están expuestas a un ambiente extremadamente duro y poseen una vida media de tan solo unos días antes de su muerte por apoptosis y su desprendimiento al tracto digestivo. La renovación del epitelio intestinal es, por tanto, un proceso continuo a lo largo de la vida. Las células nuevas se derivan de la división lenta pero continua de células madre que se encuentran al fondo de las criptas intestinales (Fig. 17.19). Las células madre dan lugar a una población de células amplificadoras de tránsito, que se dividen rápidamente y ocupan aproximadamente dos tercios de la cripta. Las células amplificadoras de tránsito proliferan durante tres a cuatro divisiones celulares y a continuación se diferencian en tres tipos celulares en la superficie del epitelio del colon: células epiteliales de absorción, y dos tipos de células secretoras, denominadas células caliciformes y células enteroendocrinas. El intestino delgado también contiene un cuarto tipo celular, las células de Paneth, que secretan agentes antibacterianos. Cada cripta suele contener seis células madre que se autorrenuevan y pueden dar lugar a todos los tipos celulares del epitelio intestinal.

Las células madre que son responsables de la renovación continua de la piel y el pelo también están bien caracterizadas. Al igual que el revestimiento del intestino, la piel y el pelo están expuestos a condiciones ambientales externas duras —que incluyen las radiaciones ultravioletas de la luz solar— y se renuevan continuamente a lo largo de la vida. La piel se compone de

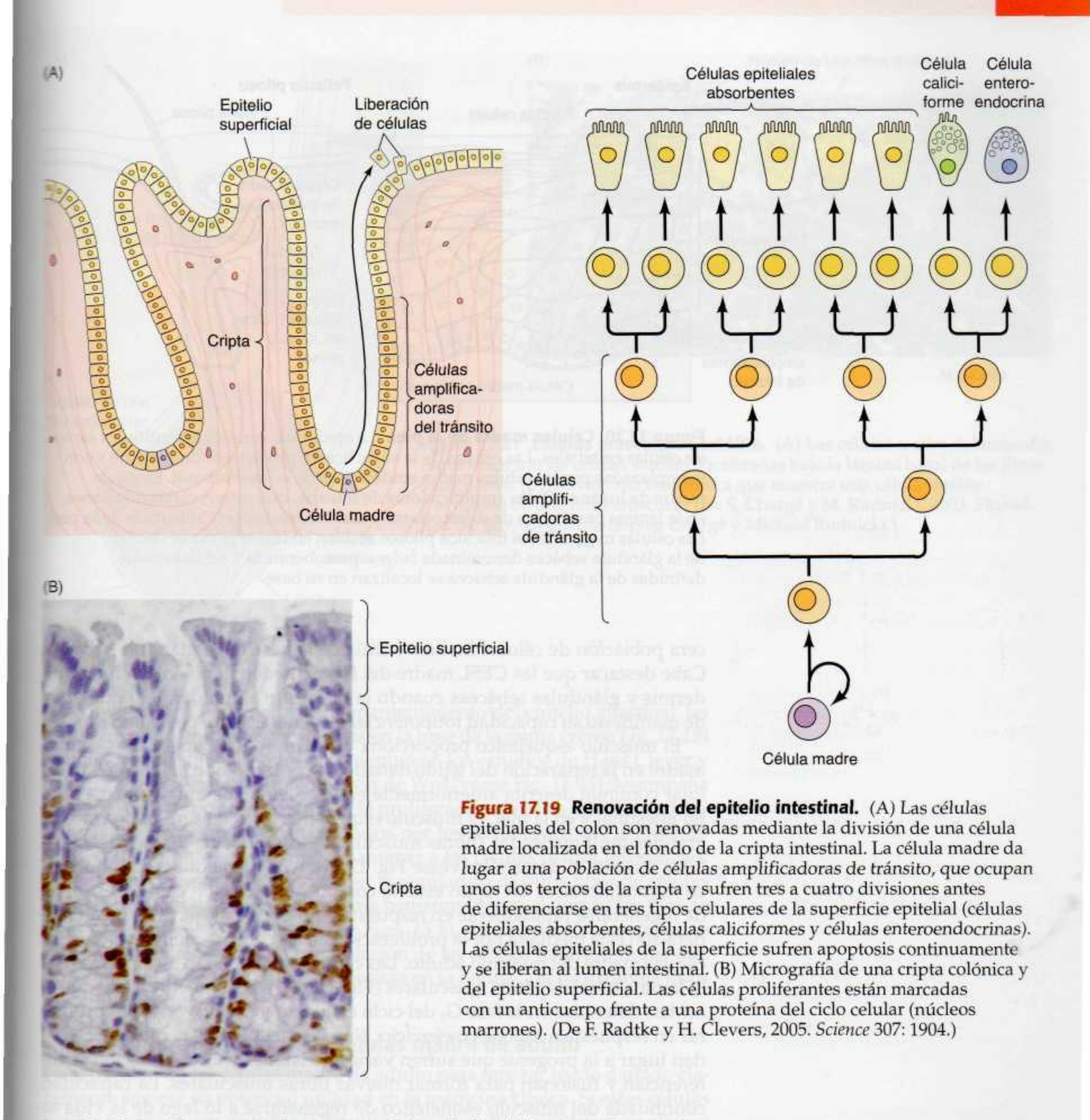


Figura 17.19 Renovación del epitelio intestinal. (A) Las células epiteliales del colon son renovadas mediante la división de una célula madre localizada en el fondo de la cripta intestinal. La célula madre da lugar a una población de células amplificadoras de tránsito, que ocupan unos dos tercios de la cripta y sufren tres a cuatro divisiones antes de diferenciarse en tres tipos celulares de la superficie epitelial (células epiteliales absorbentes, células caliciformes y células enteroendocrinas). Las células epiteliales de la superficie sufren apoptosis continuamente y se liberan al lumen intestinal. (B) Micrografía de una cripta colónica y del epitelio superficial. Las células proliferantes están marcadas con un anticuerpo frente a una proteína del ciclo celular (núcleos marrones). (De F. Radtke y H. Clevers, 2005. *Science* 307: 1904.)

tres linajes celulares principales: la epidermis, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas, que secretan aceites que lubrican la superficie cutánea. Cada una de estas tres poblaciones deriva de unas células madre específicas (Fig. 17.20). La epidermis es un epitelio formado por varias capas cuyas células están sometidas a una renovación constante. Las células madre epidérmicas, localizadas en la capa basal, sustituyen a estas células. Dichas células madre dan lugar a células de amplificación de tránsito, las cuales sufren entre tres y seis divisiones antes de diferenciarse y migrar hacia la superficie de la piel. Las células madre que generan el cabello se encuentran en una región del folículo piloso conocida como el *bulge*. Las células madre del *bulge* producen células de matriz de amplificación de tránsito, que proliferan y se diferencian para dar lugar a la vaina pilosa. Por último, una ter-

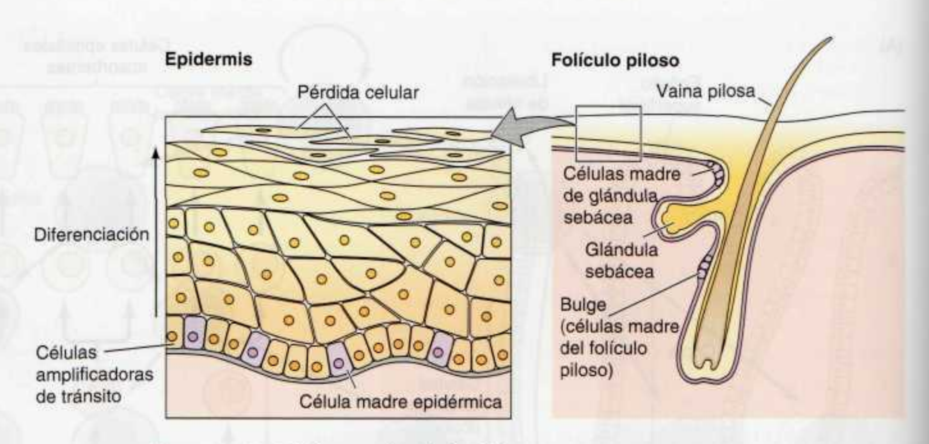


Figura 17.20 Células madre de la piel. La epidermis consiste en múltiples capas de células epiteliales. Las células de la superficie se pierden continuamente y son reemplazadas por las células madre epidérmicas de la lámina basal. La célula madre da lugar a células amplificadoras de tránsito, que sufren varias divisiones en la lámina basal antes de diferenciarse y desplazarse hacia la superficie de la piel. Las células madre de los folículos pilosos residen en una región por debajo de la glándula sebácea denominada *bulge* o protuberancia y células madre definidas de la glándula sebácea se localizan en su base.

cera población de células madre se sitúa en la base de la glándula sebácea. Cabe destacar que las CESL madre del *bulge* pueden también producir epidermis y glándulas sebáceas cuando la piel sufre algún daño, lo que pone de manifiesto su capacidad totipotencial de generar tanto piel como cabello.

El músculo esquelético proporciona un ejemplo del papel de las células madre en la reparación del tejido dañado, al contrario que la renovación celular continua descrita anteriormente en el sistema hematopoyético, epitelio intestinal y en la piel. El músculo esquelético está compuesto por células grandes multinucleadas (fibras musculares) formadas mediante fusión celular durante el desarrollo (véase Fig. 12.21). Aunque el músculo esquelético normalmente es un tejido estable con poca renovación celular, es capaz de regenerarse rápidamente en respuesta a lesiones o al ejercicio. Esta regeneración está mediada por la proliferación de las células satélite, que son las células madre del músculo adulto. Las células satélite están localizadas bajo la lámina basal de fibras musculares (Fig. 17.21). Normalmente están quiescentes, detenidas en la fase G_0 del ciclo celular, pero se activan para proliferar en respuesta a lesiones o ejercicio. Una vez activadas, las células satélite dan lugar a la progenie que sufren varias divisiones y a continuación se diferencian y fusionan para formar nuevas fibras musculares. La capacidad continuada del músculo esquelético de regenerarse a lo lago de la vida se debe a la autorrenovación de la población de células madre satélite.

Las células madre también han sido detectadas en diversos tejidos adultos, incluidos el cerebro y corazón, y es posible que la mayoría —si no todos— los tejidos contengan células madre con el potencial de reponer células que se pierden durante la vida del organismo. Aparentemente, las células madre se encuentran en microambientes diferentes, conocidos como **nichos**, que aportan las señales ambientales que mantienen a las células madre durante toda su existencia y regulan el equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación. Sin embargo, las células madre son muy infrecuentes en los tejidos adultos, por lo que la identificación exacta de estas células y sus nichos constituye un destacado desafío en el estudio de las células madre. Por ejemplo, a pesar de conocerse desde hace tiempo la función que

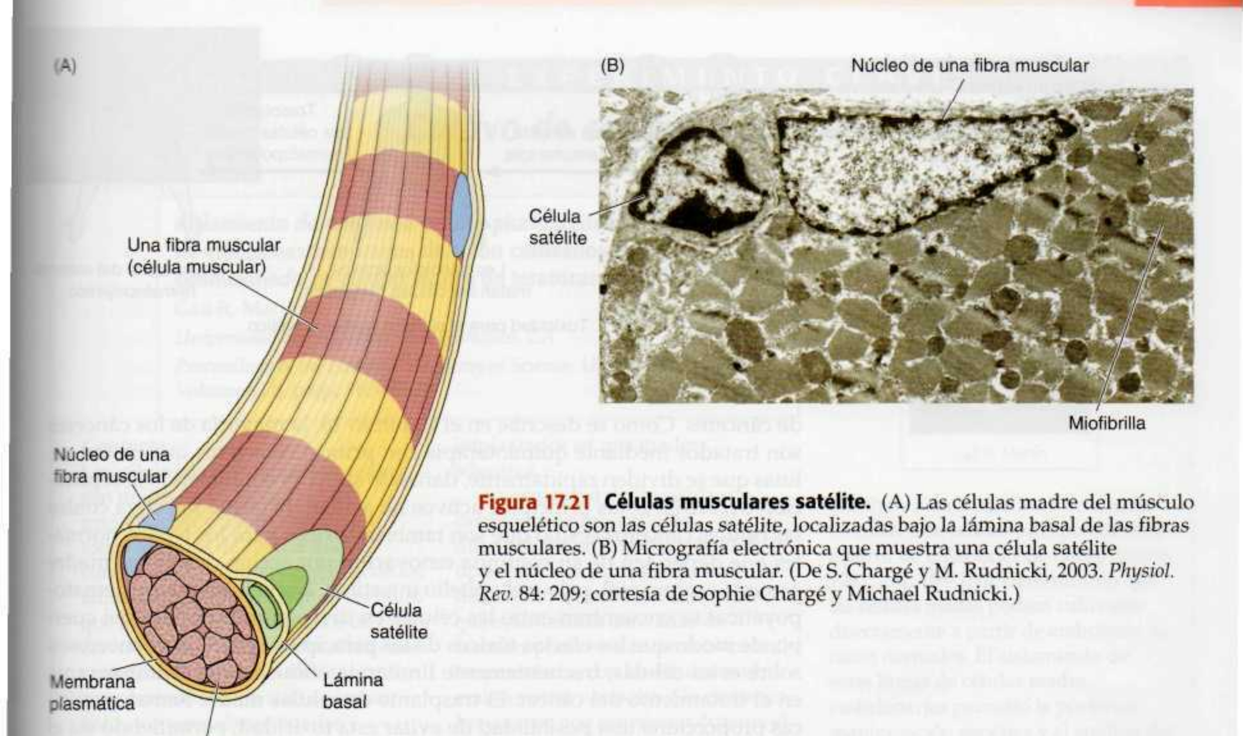


Figura 17.21 Células musculares satélite. (A) Las células madre del músculo esquelético son las células satélite, localizadas bajo la lámina basal de las fibras musculares. (B) Micrografía electrónica que muestra una célula satélite y el núcleo de una fibra muscular. (De S. Chargé y M. Rudnicki, 2003. *Physiol. Rev.* 84: 209; cortesía de Sophie Chargé y Michael Rudnicki.)

desempeñan las CESL madre en el mantenimiento del epitelio intestinal, las células madre intestinales localizadas en la base de la cripta (véase Fig. 17.19) se han identificado hace muy poco tiempo en los estudios de Hans Clever y cols. de 2007. La señalización de la vía de Wnt (véase Fig. 15.44) desempeña un papel destacado en el control de la proliferación de estas células madre y se cree que los polipéptidos secretados por los fibroblastos del tejido conjuntivo subyacente se ocupan de mantener a las células madre intestinales. De igual modo, esta vía interviene en la regulación de otros tipos de células madre, como las de la piel y el sistema hematopoyético. Además, las vías de TGF-β, Hedgehog y Notch (véanse Figs. 15.41, 15.43 y 15.45) desempeñan unos papeles destacados en la regulación de las células madre, aunque aún no se han definido sus funciones precisas en la regulación de distintos tipos de células madre.

Aplicaciones médicas de las células madre de adulto

La capacidad de las células madre de adulto para reparar tejido dañado claramente sugiere su potencial utilidad en la medicina clínica. Si estas células madre pudieran ser aisladas y amplificadas en cultivo, podrían emplearse en principio para sustituir tejidos dañados y para tratar una diversidad de trastornos, como la diabetes o trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer. En algunos casos, el uso de células madre derivadas de tejidos adultos podría ser el enfoque óptimo para dichas terapias de células madre, aunque el uso de células madre embrionarias (analizados en la siguiente sección de este capítulo) probablemente proporcione una posibilidad más versátil para el tratamiento de una variedad mayor de trastornos.

Una aplicación clínica bien establecida de las células madre de adulto es el **trasplante de células madre hematopoyéticas** (o **trasplante de médula ósea**), que juega un papel importante en el tratamiento de una diversidad

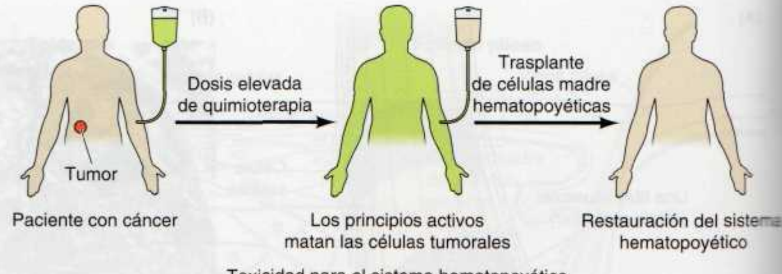


Figura 17.22 Trasplante de células madre hematopoyéticas. Un paciente con cáncer es tratado con dosis elevadas de quimioterapia, que mata las células tumorales eficazmente pero normalmente no sería tolerada debido al daño potencialmente letal para el sistema hematopoyético. Este daño es reparado a continuación mediante un trasplante de células madre hematopoyéticas nuevas.

de cánceres. Como se describe en el Capítulo 18, la mayoría de los cánceres son tratados mediante quimioterapia con principios activos que matan células que se dividen rápidamente, dañando su ADN o inhibiendo la replicación del ADN. Estos principios activos no actúan de forma selectiva contra las células cancerosas sino que son también tóxicos para los tejidos normales que dependen de su continua renovación por acción de células madre como la sangre, piel, pelo y el epitelio intestinal. Las células madre hematopoyéticas se encuentran entre las células en división más rápidas del cuerpo, de modo que los efectos tóxicos de los principios activos anticancerosos sobre estas células, frecuentemente limitan la eficacia de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer. El trasplante de células madre hematopoyéticas proporciona una posibilidad de evitar esta toxicidad, permitiendo así el uso de dosis mayores de los principios activos para tratar el cáncer del paciente de forma más efectiva. En este procedimiento, el paciente es tratado con dosis elevadas de quimioterapia que normalmente no serían toleradas debido a sus efectos tóxicos sobre el sistema hematopoyético (Fig. 17.22). El daño potencialmente letal es reparado, sin embargo, mediante la transferencia de células madre hematopoyéticas (obtenidas de la médula ósea o de sangre periférica) al paciente después de completar la quimioterapia, de forma que el sistema hematopoyético normal es restaurado. En algunos casos, las células madre se obtienen del paciente antes de la quimioterapia, son almacenadas y devueltas al paciente una vez se completa la quimioterapia. Sin embargo, es importante asegurar que estas células no están contaminadas con células cancerosas. Como alternativa, las células madre a trasplantar pueden obtenerse de un donante sano (generalmente un pariente cercano) cuyo tipo de tejido se parece estrechamente al del paciente. Además de su uso en el tratamiento de cáncer, las transferencias de células madre hematopoyéticas se emplean para tratar pacientes con patologías del sistema hematopoyético, como la anemia aplástica, trastornos de la hemoglobina y deficiencias inmunes.

Las células madre epiteliales también han encontrado una aplicación clínica en forma de trasplantes de piel que se emplean para tratar a pacientes con quemaduras, heridas y úlceras. Una técnica de estos procedimientos consiste en cultivar células de la piel epidérmica para formar una película epitelial, que puede a continuación ser transferida al paciente. Puesto que la propia piel del paciente puede emplearse en este procedimiento, se elimina la complicación potencial de rechazo del trasplante por parte del sistema inmune. Las posibilidades de emplear células madre de adulto para terapias de sustitución similares en otras patologías, incluyendo la diabetes y la enfermedad de Parkinson, y distrofias musculares, se investigan con gran interés. Sin embargo, estas aplicaciones clínicas de las células madre de adulto están limitadas por las dificultades relacionadas con el aislamiento y cultivo de las poblaciones de células madre apropiadas.

■ **La sangre procedente de cordones umbilicales almacenada procedente de un donante no relacionado también puede emplearse como fuente de células madre hematopoyéticas para el trasplante.**



EXPERIMENTO CLAVE

Cultivo de células madre embrionarias

Aislamiento de una línea celular pluripotencial a partir de embriones tempranos de ratón cultivados en medio condicionado de células madre de teratocarcinoma

Gail R. Martin

Universidad de California, San Francisco, CA

Proceedings of the National Academy of Science, USA, 1981, Volumen 78, págs. 7634-7638



Gail R. Martin

Contexto

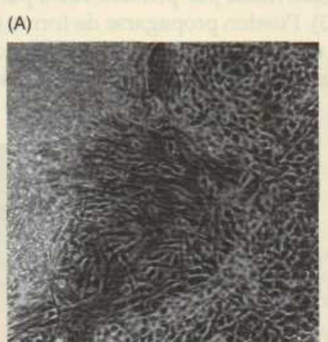
Las células de embriones tempranos son únicas en su capacidad de proliferación y diferenciación en todos los tipos de células que componen los tejidos y órganos de los animales adultos. En 1970 se encontró que los embriones tempranos de ratón con frecuencia desarrollaban tumores cuando eran retirados del útero y trasplantados en un sitio anómalo. Estos tumores, denominados teratocarcinomas, contenían células que eran capaces de formar una gama de tejidos diferentes a medida que crecían en el animal. Además, las células procedentes de los teratocarcinomas (denominadas células de carcinoma embrionario) podían aislarse y crecer en cultivo. Estas células se parecían a las células embrionarias normales y podía inducirse su diferenciación en una variedad de tipos celulares en cultivo. Algunas células de carcinoma embrionario también podían participar en el desarrollo normal de un ratón, si eran inyectadas en embriones tempranos de ratón (blastocistos) y a continuación implantados en una madre adoptiva.

La capacidad de las células de carcinoma embrionario de diferenciarse en una diversidad de tipos celulares y de participar en el desarrollo normal del ratón, sugería que estas células derivadas de tumores podían estar estrechamente emparentadas con las células madre embrionarias normales. Sin embargo, los sucesos que ocurrieron durante el establecimiento de teratocarcinomas en ratón eran desconocidos. Gail Martin hipotetizó que las células de carcinoma embrionario encontradas en los teratocarcinomas eran, esencialmente, células embrionarias normales que proliferaban anómalamente debido, sencillamente, a que cuando eran retiradas del útero y trasplantadas a un sitio extraño, no recibían las señales apropiadas para inducir la diferenciación normal. Basándose en esta hipótesis, intentó cultivar células de embriones de ratón con el objetivo de aislar líneas de células madre embrionarias normales. Sus experimentos, junto con un trabajo similar de Martin Evans y Matthew Kaufman (Establecimiento en cultivo de células pluripotenciales a partir de embriones de ratón, *Nature*, 1981, 292: 154-156), demostraron que las células madre podían cultivarse directamente a partir de embriones de ratón normales. El aislamiento de estas líneas de células madre embrionarias permitió la posterior manipulación genética y el análisis del desarrollo del ratón, además de plantear el posible uso de células madre embrionarias humanas en la terapia de trasplante.

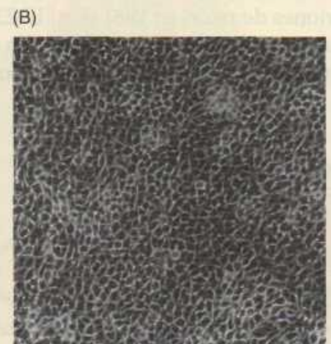
Experimentos

Basándose en la premisa de que las células de carcinoma embrionarias se derivaban a partir de células madre embrionarias normales, Martin intentó cultivar células a partir de blastocistos normales de ratón. Empezando con las células de aproximadamente 30 embriones,

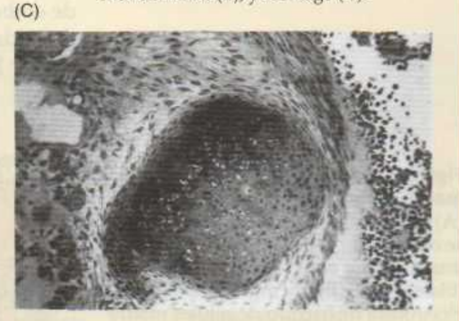
(A)



(B)



(C)



Las células madre embrionarias se diferencian en cultivo para formar una variedad de tipos celulares, incluyendo células semejantes a neuronas (A), células endodérmicas (B), y cartílago (C).

(Continúa en la página siguiente)

EXPERIMENTO CLAVE

aisló inicialmente cuatro colonias de células en crecimiento tras una semana de cultivo. Estas células podían pasarse repetidamente a cultivos en masa, y podían derivarse, de forma reproducible, en nuevas líneas celulares cuando se repetía el experimento con embriones de ratón adicionales.

Las líneas celulares derivadas a partir de embriones normales (células madre embrionarias) se asemejaban a las células de carcinoma embrionario, derivadas de tumores. Lo más importante es que podía inducirse la diferenciación de las células madre embrionarias en cultivo en una variedad de tipos celulares, incluyendo células endodérmicas, cartílago y células semejantes a neuronas (véase figura). Es más, si las células madre embrionarias eran inyectadas en un ratón, formaban tumores que contenían múltiples tipos celulares diferenciados. Parecía entonces, que las líneas de células madre embrionarias, que retenían la capacidad de diferenciarse en una amplia gama de tipos celulares, podían establecerse en cultivo a partir de embriones normales de ratón.

Impacto

El establecimiento de líneas de células madre embrionarias ha tenido un gran impacto sobre el estudio de la genética y el desarrollo del ratón, además de abrir nuevas posibilidades para el tratamiento de una variedad de enfermedades humanas. Experimentos sucesivos demostraron que las células madre embrionarias podían participar en el desarrollo normal del ratón tras su inyección en embriones murinos. Puesto que podían utilizarse técnicas de transferencia génica para introducir o mutar genes en las células madre embrionarias cultivadas, estas células se han utilizado para investigar el papel de diversos genes en el desarrollo del ratón. Como se estudió en el Capítulo 4, cualquier gen de interés puede ser inactivado en las células madre embrionarias, mediante la recombinación homóloga con un ADN clonado, y el papel de dicho gen en el desarrollo del ratón puede determinarse a continuación, introduciendo las células madre embrionarias alteradas en embriones de ratón.

En 1998, dos grupos de investigadores desarrollaron las primeras líneas de células madre embrionarias humanas. Debido a la capacidad de proliferación y diferenciación de estas células, ofrecen la posibilidad de proporcionar nuevas terapias para el tratamiento de una variedad de enfermedades. A pesar de que el número de problemas técnicos y preocupaciones éticas deben afrontarse, las terapias de trasplante basadas en el empleo de células madre embrionarias pueden proporcionar la mayor esperanza para el tratamiento de enfermedades como la de Parkinson, Alzheimer, la diabetes y las lesiones de la médula espinal.

Células madre embrionarias y clonación terapéutica

Mientas que las células madre de adultos son difíciles de aislar y cultivar, resulta relativamente sencillo aislar y amplificar las células madre procedentes de embriones tempranos (**células madre embrionarias**). Estas células pueden crecer indefinidamente como poblaciones puras de células madre mientras mantienen la capacidad de generar todos los tipos celulares diferenciados presentes en organismos adultos. Como consecuencia, ha habido un gran interés en las células madre embrionarias tanto desde el punto de vista de la ciencia básica como el de la aplicación clínica.

Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias fueron cultivadas por primera vez a partir de embriones de ratón en 1981 (Fig. 17.23). Pueden propagarse de forma indefinida en cultivo y, si se introducen en embriones tempranos, son capaces de dar lugar a células en todos los tejidos del ratón. Así retienen su capaci-



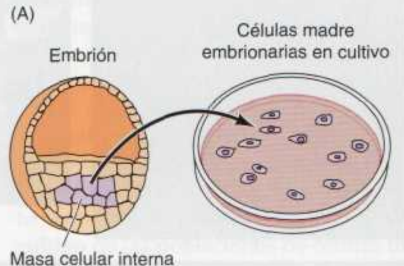




Figura 17.23 Cultivo de células madre embrionarias de mamífero. (A) Las células madre embrionarias se cultivan a partir de la masa celular interna de un embrión temprano (blastocisto). (B) Micrografía electrónica de barrido de células madre embrionarias en cultivo. (Yorgos Nikas/Photo Researchers Inc.)

dad de desarrollarse en todos los tipos celulares diferentes presentes en los tejidos y órganos adultos (conocida como **totipotencia**). Adicionalmente, pueden inducirse para diferenciarse en una diversidad de tipos diferentes de células en cultivo.

Como se describió en el Capítulo 4, las células madre embrionarias han sido una importante herramienta experimental para la biología celular porque pueden emplearse para introducir genes alterados en ratones (véase Fig. 4.36). Además, proporcionan un sistema modelo sobresaliente para el estudio de los eventos moleculares y celulares asociados con la diferenciación celular embrionaria, de forma que las células madre embrionarias han sido de considerable interés para los biólogos celulares y del desarrollo desde hace tiempo. El interés por estas células alcanzó un nuevo máximo de intensidad, sin embargo, en 1998 cuando dos grupos de investigadores describieron el aislamiento de células madre a partir de embriones humanos, surgiendo la posibilidad de emplear las células madre embrionarias en terapias de trasplante clínico.

Las células madre embrionarias de ratón se cultivan en presencia de un factor de crecimiento denominado LIF (factor inhibidor de la leucemia), que señaliza a través de la vía JAK/STAT (véase Fig. 15.40) y es necesario para mantener a estas células en su estado indiferenciado (Fig. 17.24). Si se retira el LIF del medio, las células se agregan en estructuras que se parecen a embriones (cuerpos embrioides) y a continuación se diferencian en una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo neuronas, adipocitos, células sanguíneas, células epiteliales, células del músculo liso vascular, e incluso células de músculo cardíaco que laten. Las células madre embrionarias no requieren LIF pero se mantienen en un estado indiferenciado de forma similar mediante otros factores de crecimiento, que no han sido completamente caracterizados por el momento.

Es importante resaltar que las células madre embrionarias pueden ser dirigidas para diferenciarse a lo largo de vías específicas mediante la adición

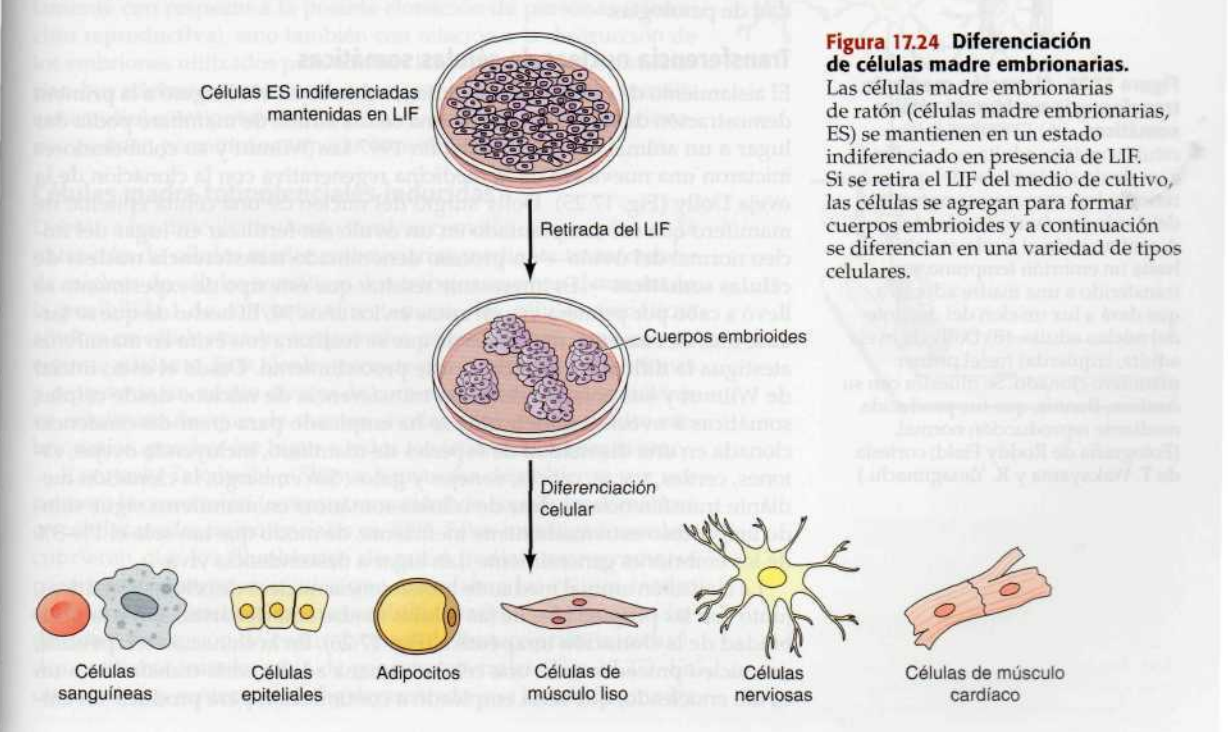


Figura 17.24 Diferenciación de células madre embrionarias. Las células madre embrionarias de ratón (células madre embrionarias, ES) se mantienen en un estado indiferenciado en presencia de LIF. Si se retira el LIF del medio de cultivo, las células se agregan para formar cuerpos embrioides y a continuación se diferencian en una variedad de tipos celulares.

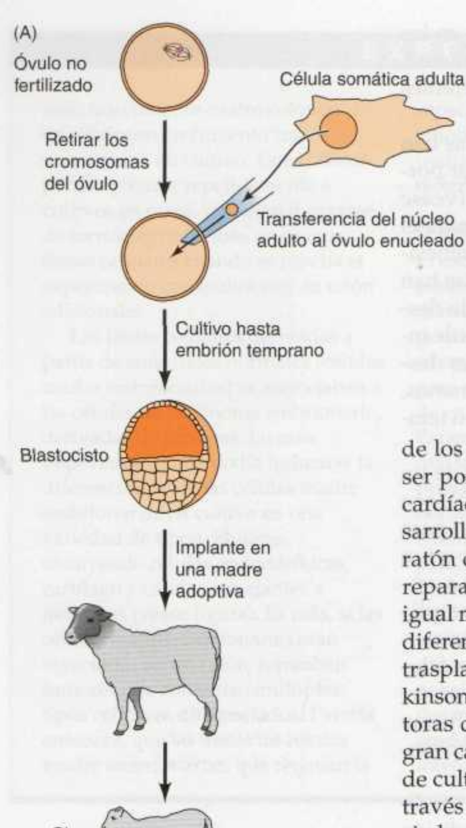




Figura 17.25 Clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas. (A) El núcleo de una célula somática adulta es transferido a un óvulo sin fertilizar del que se han retirado los cromosomas normales del óvulo (un óvulo enucleado). A continuación el óvulo es cultivado hasta un embrión temprano y es transferido a una madre adoptiva, que dará a luz un clon del donante del núcleo adulto. (B) Dolly (la oveja adulta, izquierda) fue el primer mamífero clonado. Se muestra con su cordero, Bonnie, que fue producida mediante reproducción normal. (Fotografía de Roddy Field; cortesía de T. Wakayama y R. Yanagimachi.)

de los factores de crecimiento apropiados al medio de cultivo. Así, puede ser posible derivar población de tipos celulares específicos, como células cardíacas o nerviosas, para terapias de trasplante. Por ejemplo, se han desarrollado métodos para dirigir la diferenciación de células madre tanto de ratón como del ser humano en miocardiocitos, que se han empleado para reparar lesiones cardíacas debidas a infarto de miocardio en ratones. De igual modo, se ha logrado avanzar de forma considerable en el control de la diferenciación de las células madre embrionarias en neuronas utilizadas en trasplantes terapéuticos en modelos de roedores de la enfermedad de Parkinson y lesiones de médula espinal, así como células pancreáticas productoras de insulina, aplicadas al tratamiento de la diabetes en el ratón. Una gran cantidad de la investigación actual se centra en el desarrollo de medios de cultivo para estimular la diferenciación de células madre embrionarias a través de vías específicas, produciendo así poblaciones de células diferenciadas que puedan ser empleadas en terapias de trasplante en una diversidad de patologías.

Transferencia nuclear de células somáticas

El aislamiento de células embrionarias humanas en 1998 siguió a la primera demostración de que el núcleo de una célula adulta de mamífero podía dar lugar a un animal clonado viable. En 1997 Ian Wilmut y su colaboradores iniciaron una nueva era de la medicina regenerativa con la clonación de la oveja Dolly (Fig. 17.25). Dolly surgió del núcleo de una célula epitelial de mamífero que fue trasplantado en un óvulo sin fertilizar en lugar del núcleo normal del óvulo —un proceso denominado **transferencia nuclear de células somáticas**—. Es interesante resaltar que este tipo de experimento se llevó a cabo por primera vez en ranas en los años 50. El hecho de que se tardase más de cuarenta años antes de que se realizara con éxito en mamíferos atestigua la dificultad técnica de este procedimiento. Desde el éxito inicial de Wilmut y sus colaboradores, la transferencia de núcleos desde células somáticas a ovocitos enucleados se ha empleado para crear descendencia clonada en una diversidad de especies de mamífero, incluyendo ovejas, ratones, cerdos, vacas, cabras, conejos y gatos. Sin embargo, la clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas en mamíferos sigue siendo un proceso extremadamente ineficiente, de modo que tan solo el 1%-3% de los embriones generalmente dan lugar a descendencia viva.

La clonación animal mediante transferencia nuclear de células somáticas, junto con las propiedades de las células madre embrionarias, abren la posibilidad de la **clonación terapéutica** (Fig. 17.26). En la clonación terapéutica, un núcleo procedente de una célula humana adulta sería transferido a un óvulo enucleado, que sería empleado a continuación para producir un em-

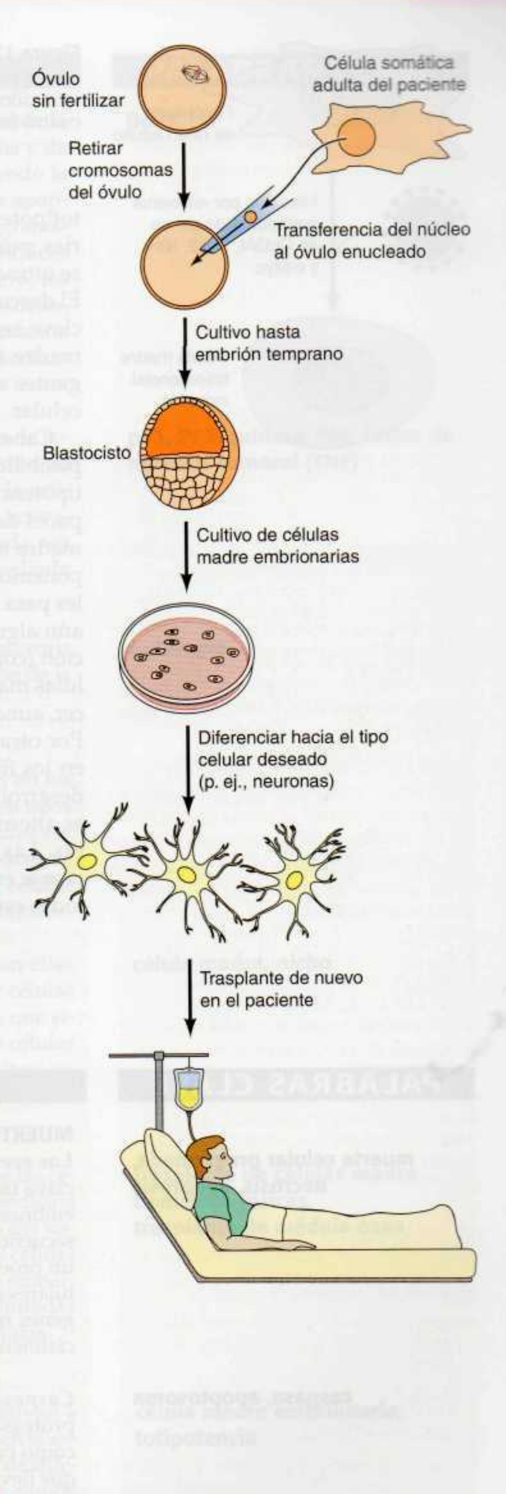


Figura 17.26 Clonación terapéutica. En la clonación terapéutica, el núcleo de una célula del paciente sería transferido a un óvulo enucleado, que sería cultivado hasta dar un embrión temprano. A continuación, las células madre embrionarias se derivarían y diferenciarían hacia el tipo celular deseado y trasplantadas de nuevo en el paciente. Las células trasplantadas serían genéticamente idénticas a las del receptor (quien fue el donante del núcleo adulto), de forma que se evitarían las complicaciones de rechazo inmune.

brión temprano en cultivo. Las células madre embrionarias podrían entonces ser cultivadas a partir del embrión clonado y empleadas para generar los tipos apropiados de células diferenciadas para la terapia de trasplante. La principal ventaja proporcionada por la clonación terapéutica es que las células madre embrionarias derivadas de este procedimiento serían genéticamente idénticas al receptor del trasplante, que fue el donante del núcleo de la célula somática adulta. Esto sobrepasa la barrera del sistema inmune en el rechazo del tejido trasplantado.

La posibilidad de la clonación terapéutica supone la aproximadamente más general para el tratamiento de un amplio abanico de trastornos devastadores frente a los cuales podría utilizarse el tratamiento mediante trasplante de células madre. No obstante, aunque se han cosechado algunos éxitos en los modelos animales, siguen existiendo algunos obstáculos considerables que deberán salvarse antes de que la clonación terapéutica pueda aplicarse en el ser humano. Se necesitan mejoras sustanciales para superar la baja eficiencia de los métodos de transferencia de núcleos de células somáticas empleados para producir embriones. Por otra parte, la clonación terapéutica mediante transferencia de núcleos de células somáticas ha suscitado algunas preocupaciones éticas, no solamente con respecto a la posible clonación de personas (**clonación reproductiva**), sino también con relación a la destrucción de los embriones utilizados para obtener las células madre embrionarias. Los adelantos recientes de reprogramación de células somáticas en células totipotenciales similares a células madre embrionarias podrían permitirnos superar estas dificultades.

Células madre totipotenciales inducidas

Debido a las dificultades tanto técnicas como éticas que plantea la obtención de células madre embrionarias mediante transferencia de núcleos de células somáticas, los trabajos que han demostrado la posibilidad de convertir directamente las células somáticas adultas en células madre totipotentes en cultivo han supuesto un enorme adelanto. Esta técnica permite prescindir de los embriones y representa un medio directo de conversión de células somáticas en células madre que, de manera similar a las células madre embrionarias, pueden dar lugar a todos los tejidos de un organismo.

Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka describieron por vez primera la conversión (o reprogramación) de las células somáticas en células madre totipotenciales en 2006. Estos investigadores descubrieron que los fibroblastos de ratón podían reprogramarse para transformarse en células que remedaban las células madre embrionarias (bautizadas como **células madre embrionarias inducidas**) por acción de cuatro factores de transcripción introducidos mediante transferencia de genes retrovirales (Fig. 17.27). En otros trabajos posteriores se ha demostrado que las células madre

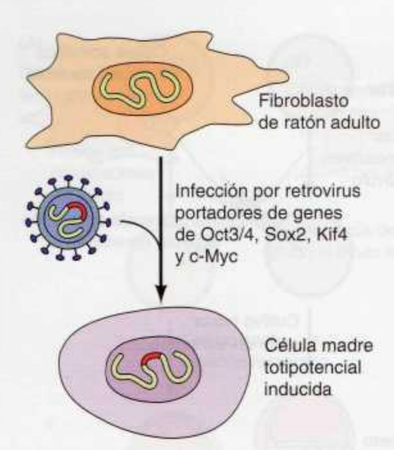


Figura 17.27 Células madre totipotenciales inducidas. Los fibroblastos de ratón adulto cultivados *in vitro* se convierten en células madre totipotenciales mediante la infección por vectores retrovirales (véase Fig. 4.34) que portan genes que codifican cuatro factores de transcripción: Oct3/4, Sox2, Kif4 y c-Myc.

totipotenciales inducidas, de manera similar a las células madre embrionarias, pueden diferenciarse para dar lugar a todos los tipos celulares cuando se introducen en embriones de ratón en una fase temprana de su desarrollo. El descubrimiento que la acción de tan solo cuatro factores de transcripción clave sea suficiente para reprogramar células somáticas adultas en células madre totipotenciales ha sido sorprendente y plantea diversos interrogantes acerca de los programas transcripcionales que controlan el destino celular.

Cabe destacar que en algunos estudios posteriores se ha demostrado la posibilidad de reprogramar los fibroblastos humanos adultos en células totipotenciales a través de una técnica similar. Por tanto, hoy en día somos capaces de convertir directamente células cutáneas de un paciente en células madre totipotenciales inducidas en condiciones *in vitro*, de modo que disponemos de un nuevo método de obtención de células madre totipotenciales para su aplicación en el tratamiento con trasplante. No obstante, quedan aún algunos problemas por resolver. Algunos de los factores de transcripción (como c-Myc) que se utilizan para reprogramar los fibroblastos en células madre totipotenciales pueden actuar como oncogenes y producir cáncer, aunque podrían sustituirse por otros factores sin potencial oncogénico. Por otra parte, los vectores retrovirales empleados para introducir genes en los fibroblastos pueden inducir mutaciones nocivas que conducirían al desarrollo de tumores, por lo que será necesario poner a punto metodologías alternativas de transferencia génica con aplicaciones terapéuticas seguras. Las células madre totipotenciales inducidas podrían establecerse y usarse en tratamientos de trasplante individualizados en cuanto se superen todas estas dificultades.

PALABRAS CLAVE

muerte celular programada, necrosis, apoptosis

caspasa, apoptosoma

RESUMEN

MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Los eventos de la apoptosis: La muerte celular programada juega un papel clave tanto en el mantenimiento de los tejidos adultos como en el desarrollo embrionario. Al contrario que la muerte accidental de las células como consecuencia de una lesión aguda, la muerte celular programada tiene lugar vía un proceso activo de apoptosis. Las células apoptóticas y los fragmentos celulares son a continuación eliminados con eficacia mediante fagocitosis. Los genes responsables de la regulación y ejecución de la apoptosis fueron inicialmente identificados mediante el análisis genético de *C. elegans*.

Caspasas: los ejecutores de la apoptosis: Las caspasas son una familia de proteasas que son las efectoras de la apoptosis. Las caspasas se clasifican como caspasas iniciadoras o efectoras, y ambas funcionan en una cascada que lleva hacia la muerte celular. En las células de mamífero, la principal caspasa iniciadora es activada en un complejo denominado apoptosoma, que también requiere el citocromo *c* liberado desde las mitocondrias.

RESUMEN

Reguladores centrales de la apoptosis: la familia Bcl-2: Los miembros de la familia Bcl-2 son reguladores centrales de la activación de las caspasas y de la apoptosis. Algunos miembros de la familia Bcl-2 funcionan inhibiendo la apoptosis (antiapoptóticos) mientras que otros actúan estimulando la apoptosis (proapoptóticos). Las señales que controlan la muerte celular programada alteran el equilibrio entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2, que se regulan entre sí. En las células de mamífero, los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 actúan en las mitocondrias, donde estimulan la liberación de citocromo *c*, desencadenando la activación de las caspasas. Las caspasas también están reguladas directamente mediante las proteínas inhibidoras IAP.

Vías de señalización que regulan la apoptosis: Una diversidad de vías de señalización regulan la apoptosis, controlando la expresión o la actividad de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2. Estas vías incluyen la activación inducida por el ADN lesionado del supresor tumoral p53, la activación estimulada por factores de crecimiento de la señalización mediada por PI 3-quinasa/Akt, y la activación de los receptores de muerte mediada por polipéptidos que inducen la muerte celular programada.

Vías alternativas de muerte celular programada. La autofagia y la necrosis regulada son dos mecanismos alternativos de apoptosis en la inducción de la muerte celular programada.

CÉLULAS MADRE Y MANTENIMIENTO DE LOS TEJIDOS ADULTOS

Proliferación de las células diferenciadas: La mayoría de las células en los animales adultos están detenidas en fase G_0 del ciclo celular. Algunos tipos de células diferenciadas, incluidos los fibroblastos de la piel, las células endoteliales, las células de músculo liso y las células hepáticas son capaces de reiniciar la proliferación a medida que sea necesario para reemplazar células que se han perdido como consecuencia de una lesión o de la muerte celular.

Células madre: La mayoría de las células diferenciadas no proliferan ellas mismas, sino que pueden ser sustituidas mediante la proliferación de células madre. Las células madre se dividen para dar lugar a una célula hija que sigue siendo una célula madre, y otra que se divide y se diferencia. Las células madre han sido identificadas en una amplia variedad de tejidos adultos, incluyendo el sistema hematopoyético, la piel, el intestino, el músculo esquelético, el cerebro y el corazón.

Aplicaciones médicas de las células madre de adulto: La capacidad de las células madre de reparar tejido dañado sugiere su potencial uso en la medicina clínica. Las células madre de adulto se emplean para reparar lesiones del sistema hematopoyético mediante células madre hematopoyéticas, y las células madre epidérmicas pueden emplearse para los trasplantes de piel. Sin embargo, las aplicaciones clínicas de las células madre de adulto están limitadas por las dificultades asociadas con el aislamiento y cultivo de estas células.

CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y CLONACIÓN TERAPÉUTICA

Células madre embrionarias: Las células madre embrionarias se cultivan a partir de embriones tempranos. Pueden crecer con relativa sencillez en el estado indiferenciado en cultivo mientras que mantienen su capacidad de diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares, de modo que puede ofrecer ventajas considerables sobre las células madre de adulto en muchas aplicaciones clínicas.

PALABRAS CLAVE

Bcl-2, IAP

p53, PI 3-quinasa, Akt, factor de necrosis tumoral (TNF)

autofagia

célula madre, nicho

trasplante de células madre hematopoyéticas, trasplante de médula ósea

célula madre embrionaria, totipotencia

PALABRAS CLAVE

transferencia nuclear de células somáticas, clonación terapéutica, clonación reproductiva.

células madre totipotenciales inducidas

RESUMEN

Transferencia nuclear de células somáticas: Los mamíferos han sido clonados mediante transferencia nuclear de células somáticas en la que el núcleo de una célula somática adulta es trasplantado en un óvulo enucleado. Esto abre la posibilidad de la clonación terapéutica en la que las células madre embrionarias se derivarían a partir de un núcleo clonado. A pesar de que se deben superar muchos obstáculos, la posibilidad de la clonación terapéutica ofrece grandes promesas para el desarrollo de nuevos tratamientos para una diversidad de patologías devastadoras.

Células madre totipotenciales inducidas: las células somáticas adultas pueden convertirse en células madre totipotenciales en condiciones *in vitro* por acción de cuatro factores de transcripción, lo que podría suponer un método alternativo de producción de células madre para el trasplante terapéutico.

Preguntas

1. ¿Por qué la muerte celular vía apoptosis es más ventajosa para los organismos multicelulares que la muerte celular vía lesión aguda?

2. ¿Qué mecanismos moleculares regulan la actividad de las caspasas?

3. Has expresado mutantes de lamininas nucleares en fibroblastos humanos. El residuo de Asp en la diana de escisión de las caspasas ha sido mutado a una Glu en estas lamininas. ¿Cómo afectarían estas lamininas mutantes a la progresión de la apoptosis?

4. ¿Cómo regulan las proteínas de la familia Bcl-2 la apoptosis en células de mamífero?

5. ¿Cómo afecta la activación de p53 en respuesta al ADN lesionado a la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular?

6. Has construido un mutante de Bad en el que la diana para la fosforilación por Akt ha sido mutada, de forma que Akt ya no la fosforila. ¿Cómo afectaría la expresión de este mutante a la supervivencia celular?

7. ¿Cómo afectaría a la apoptosis la expresión de ARNsi dirigido frente a las proteínas 14-3-3?

8. Estás considerando el tratamiento de un paciente leucémico con TNF. En un análisis más detallado determinas que las células leucémicas poseen una mutación desactivadora de la caspasa-8 ¿Será el tratamiento con TNF una terapia eficaz para este paciente?

9. ¿Cómo afectaría el ARNsi frente a Ced-3 al desarrollo de *C. elegans*?

10. Has aislado un polipéptido a partir de una planta tóxica, que se localiza en las mitocondrias después de su endocitosis en células de mamífero. El polipéptido se agrega y forma grandes canales en la membrana mitocondrial externa, liberando proteínas del espacio intermembrana en el citosol. ¿Cómo afectará el tratamiento con este polipéptido a células de mamífero en cultivo?

11. Muchos tejidos adultos contienen células diferenciadas de forma terminal que son incapaces de proliferar. Sin embargo, estos tejidos pueden regenerarse después de una lesión. ¿Qué les confiere a estos tejidos su capacidad regenerativa?

12. ¿Cuál es la propiedad crítica de las células madre?

13. ¿Cuáles son las ventajas potenciales de las células madre embrionarias en comparación con las células madre de adulto para las aplicaciones terapéuticas?

Bibliografía

Muerte celular programada

Danial, N. K. and S. J. Korsmeyer. 2004. Cell death: Critical control points. *Cell* 116: 205–219. [R]

Datta, S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg. 1999. Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Dev.* 13: 290–2927. [R]

Degterev, A. and J. Yuan. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Rev. Cell Mol. Biol.* 9: 378–390. [R]

Ellis, H. M. and H. R. Horvitz. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44: 817–829. [P]

Hay, B. A. and M. Guo. 2006. Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 623–650. [R]

Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770–776. [R]

Holcik, M. and N. Sonenberg. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 318–327. [R]

Jacobson, M. D., M. Weil and M. C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347–354. [R]

Jope, R. S. and G. V. W. Johnson. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29: 95–102. [R]

Lauber, K., S. G. Blumenthal, M. Waibel and S. Wesselborg. 2004. Clearance of apoptotic cells: Getting rid of the corpses. *Mol. Cell* 14: 277–287. [R]

Levine, B. and G. Kroemer. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27–42. [R]

Riedl, S. J. and G. S. Salvesen. 2007. The apoptosome: signaling platform of cell death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 405–413. [R]

Samejima, K. and W. C. Earnshaw. 2005. Trashing the genome: The role of nucleases during apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 677–688. [R]

Spierings, D., G. McStay, M. Saleh, C. Bender, J. Chipuk, U. Maurer and D. R. Green. 2005. Connected to death: The (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 310: 66–67. [R]

Taylor, R. C., S. P. Cullen and S. J. Martin. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 231–241. [R]

Vaux, D. L. and J. Silke. 2005. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 287–297. [R]

Vousden, K. H. and X. Lu. 2002. Live or let die: The cells response to p53. *Nature Rev. Cancer* 2: 594–604. [R]

Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science* 296: 1635–1636. [R]

Youle, R. J. and A. Strasser. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 47–59. [R]

Yu, J. and L. Zhang. 2005. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 331: 851–858. [R]

Zong, W.-X. and C. B. Thompson. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 20: 1–15. [R]

Células madre y mantenimiento de los tejidos adultos

Barker, N., M. van de Wetering and H. Clevers. 2008. The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 22: 1856–1864. [R]

Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med.* 9: 653–660. [R]

Daley, G. Q. and D. T. Scadden. 2008. Prospects for stem cell-based therapy. *Cell* 132: 544–548. [R]

Dhawan, J. and T. A. Rando. 2005. Stem cells in postnatal myogenesis: Molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* 15: 666–672. [R]

Fuchs, E. 2008. Skin stem cells: rising to the surface. *J. Cell Biol.* 180: 273–284. [R]

Fuchs, E. and V. Horsley. 2008. More than one way to skin… *Genes Dev.* 22: 976–985. [R]

Jones, D. L. and A. J. Wagers. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 11–21. [R]

Kuang, S. and M. A. Rudnicki. 2008. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol. Med.* 14: 82–91. [R]

Mayhall, E. A., N. Paffett-Lugassy and L. I. Zon. 2004. The clinical potential of stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 713–720. [R]

McCulloch, E. A. and J. E. Till. 2005. Perspectives on the properties of stem cells. *Nature Med.* 11: 1026–1028. [R]

Morrison, S. J. and A. C. Spradling. 2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132: 598–611. [R]

Orkin, S. H. and L. I. Zon. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132: 631–644. [R]

Shi, X. and D. J. Garry. 2006. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 20: 1692–1708. [R]

Taub, R. 2004. Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 836–847. [R]

Wang, D.-Z. and E. N. Olson. 2004. Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 558–566. [R]

Wu, S. M., K. R. Chien and C. Mummery. 2008. Origins and fates of cardiovascular progenitor cells. *Cell* 132: 537–543. [R]

Zhao, C., W. Deng and F. H. Gage. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132: 645–660. [R]

Células madre embrionarias y clonación terapéutica

Guasch, G. and E. Fuchs. 2005. Mice in the world of stem cell biology. *Nature Genet.* 37: 1201–1206. [R]

Jaenisch, R. and R. Young. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132: 567–582. [R]

Murry, C. E. and G. Keller. 2008. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132: 661–680. [R]

Park, I.-H., R. Zhao, J. A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T. A. Ince, P. H. Lerou, M. W. Lensch and G. Q. Daley. 2007. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451: 141–147. [P]

Rhind, S. M., J. E. Taylor, P. A. DeSousa, T. J. King, M. McGarry and I. Wilmut. 2003. Human cloning: Can it be made safe? *Nature Genet.* 4: 855–864. [R]

Shamblott, M. J., J. Axelman, S. Wang, E. M. Bugg, J. W. Littlefield, P. J. Donovan, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins and J. D. Gearhart. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13726–13731. [P]

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861–872. [P]

Takahashi, K. and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676. [P]

Thompson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknotz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145–1147. [P]

Wilmut, I., N. Beaujean, P. A. de Sousa, A. Dinnyes, T. J. King, L. A. Paterson, D. N. Wells and L. E. Young. 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419: 583–586. [R]

Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. S. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810–813. [P]

Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin and J. A. Thomson. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917–1920. [P]

CAPÍTULO 18

Cáncer

La descripción más temprana del cáncer se encuentra en un papiro egipcio que data de en torno al 3000 aC. Se cree que Hipócrates fue quien acuñó la palabra cáncer. Al parecer, la forma de los tumores le recordaron a los cangrejos y empleó las palabras carcinos, carcinoma y cáncer, que se refieren a cangrejos en griego, para describir los tumores.

EL CÁNCER ES UN TEMA APROPIADO para el último capítulo de este libro, ya que se debe a la alteración de los mecanismos reguladores que dirigen el comportamiento de la célula normal. Como ya se trató en capítulos anteriores, la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células individuales en los organismos pluricelulares se regulan cuidadosamente para atender los requerimientos del organismo como un todo. Esta regulación no existe en las células cancerosas, que crecen y se dividen de una manera incontrolada, y que en última instancia se propagan por todo el cuerpo e interfieren con la función de los tejidos y de los órganos sanos.

Puesto que el cáncer se debe a alteraciones en los mecanismos fundamentales de la regulación celular, es una enfermedad que en último término ha de ser caracterizada a los niveles molecular y celular. En efecto, la comprensión del cáncer ha sido un objetivo de los biólogos moleculares y celulares durante muchos años. De igual forma, el estudio de las células cancerosas también ha ayudado a esclarecer los mecanismos que regulan el comportamiento de las células sanas. De hecho, muchas de las proteínas que desempeñan papeles clave en la señalización celular en la regulación del ciclo celular, y en el control de la muerte celular programada se identificaron por primera vez porque alteraciones en su actividad causaban la proliferación incontrolada de las células cancerosas. Por tanto, el estudio del cáncer ha contribuido de manera significativa a nuestro conocimiento de la regulación de las células sanas y viceversa.

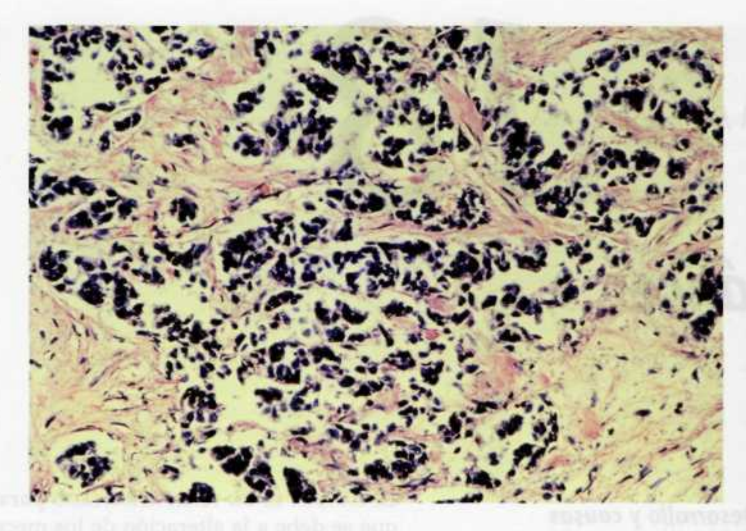
Desarrollo y causas del cáncer

La principal alteración que causa el desarrollo de un cáncer es la proliferación continua e incontrolada de las células cancerosas. En vez de responder apropiadamente a las señales que controlan el comportamiento celular normal, las células cancerosas crecen y se dividen de manera incontrolada, invadiendo los tejidos y los órganos sanos y, finalmente, diseminándose por todo el cuerpo. La pérdida generalizada del control del crecimiento que muestran las células cancerosas es el resultado neto de la acumulación de alteraciones en múltiples sistemas reguladores de la célula, y se refleja en varios aspectos del comportamiento celular que diferencian a las células cancerosas de sus equivalentes sanas.

Tipos de cáncer

El cáncer se puede producir por la proliferación anormal de cualquiera de los diferentes tipos de células del cuerpo, por lo que hay más de 100 tipos

Figura 18.1 Cáncer de páncreas. Micrografía de luz de una sección a través de páncreas en la que se observa un cáncer pancreático. Las células cancerosas poseen núcleos de color violeta, y están invadiendo el tejido normal (rosa). (Astrid y Hanns-Frieder Michler/SPL/Photo Researchers, Inc.)



distintos de cáncer que pueden diferir sustancialmente en su comportamiento y respuesta al tratamiento. La cuestión más importante en la patología del cáncer es distinguir entre tumores benignos y malignos. Un **tumor** es una proliferación anormal de las células, que puede ser benigno o maligno. Un **tumor benigno**, como las verrugas comunes de la piel, permanece confinado en su localización original, sin invadir el tejido sano adyacente ni propagarse a lugares distantes del cuerpo. Sin embargo, un **tumor maligno** es capaz de invadir el tejido normal adyacente (Fig. 18.1) y de propagarse por el cuerpo mediante los sistemas circulatorio o linfático (**metástasis**). Sólo a los tumores malignos se les denomina propiamente como cánceres, y es su capacidad para invadir y dar lugar a la metástasis lo que convierte al cáncer en algo tan peligroso. Mientras que los tumores benignos pueden eliminarse mediante cirugía, la difusión de los tumores malignos a lugares del cuerpo distantes los suele hacer resistentes a este tratamiento local.

Tanto los tumores malignos como los benignos se clasifican de acuerdo al tipo de célula del que proceden. La mayoría de los cánceres se incluyen en uno de tres tipos principales: carcinomas, sarcomas y leucemias o linfomas. Los **carcinomas**, que incluyen aproximadamente al 90% de los cánceres humanos, son alteraciones de las células epiteliales. Los **sarcomas**, que son raros en humanos, son tumores sólidos de tejidos conectivos, como el músculo, hueso, cartílago y tejido fibroso. Las **leucemias** y los **linfomas**, que contabilizan aproximadamente el 8% de los casos en humanos, surgen a partir de las células hematopoyéticas y de las células del sistema inmune, respectivamente. Estos tumores se clasifican a su vez atendiendo al tejido de origen (p. ej., carcinoma de pulmón o de mama) y al tipo de célula involucrada. Por ejemplo, los fibrosarcomas surgen a partir de los fibroblastos, y las leucemias eritroides a partir de los precursores de los eritrocitos (glóbulos rojos sanguíneos).

Aunque hay muchos tipos de cáncer, sólo son mayoritarios unos pocos (Tabla 18.1). En Estados Unidos se diagnostican anualmente más de un millón de casos de cáncer, y más de 500.000 americanos mueren de cáncer al año. Casi el 80% de la incidencia total del cáncer se debe a los que afectan a once zonas distintas del cuerpo. Los cánceres más comunes, que constituyen más de la mitad de los casos de cáncer, son los de mama, próstata, pulmón y colon/recto. El cáncer de pulmón, con mucho el más letal, es el responsable de cerca del 30% de todas las muertes por cáncer.

■ A pesar de que el cáncer ha estado con nosotros a lo largo de la historia del hombre, se ha convertido en una de las principales causas de muerte sólo en el último siglo. Antes de 1900, la mayoría de las muertes se debían a enfermedades infecciosas, como la neumonía y la tuberculosis, y la esperanza de vida era inferior a los 50 años. El cáncer era una patología infrecuente que era responsable de un pequeño porcentaje de las muertes.

Tabla 18.1 Cánceres más frecuentes en Estados Unidos

Localización del cáncer	Casos por año	Muertes por año
Próstata	218.900 (15,1%)	27.100 (4,8%)
Pulmón	213.400 (14,8%)	160.400 (28,6%)
Mama	180.500 (12,5%)	40.900 (7,3%)
Colon/recto	153.800 (10,6%)	52.200 (9,3%)
Linfomas	71.400 (4,9%)	19.700 (3,5%)
Vejiga	67.200 (4,7%)	13.800 (2,5%)
Piel (melanoma)	59.900 (4,1%)	8.100 (1,4%)
Riñón	51.200 (3,6%)	12.900 (2,3%)
Útero	50.200 (3,5%)	11.100 (2,0%)
Leucemia	44.200 (3,1%)	21.800 (3,9%)
Páncreas	37.200 (2,6%)	33.400 (6,0%)
Subtotal	1.148.000 (79,4%)	401.400 (71,8%)
Todos los sitios	1.445.000 (100%)	560.000 (100%)

Fuente: American Cancer Society, *Cancer Facts and Figures—2005.*

Desarrollo del cáncer

Una de las características fundamentales del cáncer es que los tumores son clones, es decir, los tumores se desarrollan a partir de una única célula que prolifera de manera anormal. El origen de muchos tumores a partir de una única célula se ha demostrado mediante el análisis de la inactivación del cromosoma X (Fig. 18.2). Como ya se trató en el Capítulo 7, un miembro del par de cromosomas X se inactiva en las células femeninas y pasa al estado de heterocromatina. La inactivación del cromosoma X ocurre al azar durante el desarrollo embrionario, por lo que uno de los cromosomas X es inactivado en algunas células mientras que en otras se inactiva el otro cromosoma X. Por tanto, si una hembra es heterocigota para un gen del cromosoma X, se expresarán alelos distintos en células distintas. Los tejidos sanos se componen de una mezcla de células con cromosomas X inactivos diferentes, por lo que en los tejidos normales de hembras heterocigotas se detecta la expresión de ambos alelos. Por el contrario, en los tejidos tumorales se suele expresar sólo un alelo de un gen heterocigoto portado por el cromosoma X. Esto implica que todas las células que constituyen ese tumor derivan de una única célula original, en la que se fijó el patrón de inactivación del cromosoma X antes de que el tumor se desarrollara.

Sin embargo, el origen clonal de los tumores no implica que la célula progenitora original que da lugar al tumor tenga, en principio, todas las características de una célula cancerosa. Por el contrario, el desarrollo del cáncer es un proceso «multietapa», en el que las células se convierten en malignas progresivamente a través de una serie de alteraciones. Un dato que indica el desarrollo multietapa del cáncer es que la mayoría de los cánceres se desarrollan en las etapas tardías de la vida. Por ejemplo, la incidencia del cáncer de colon se incrementa por un factor de más de diez entre los 30 y 50 años de edad, y por otro factor de diez, entre los 50 y 70 años (Fig. 18.3). Este incremento tan drástico de la incidencia del cáncer con la edad sugiere que la mayoría de los cánceres se desarrollan como consecuencia de múltiples alteraciones, que se acumulan durante muchos años.

A nivel celular, el desarrollo del cáncer se considera un proceso multietapa constituido por la mutación y selección de aquellas células con una capacidad cada vez mayor de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis (Fig. 18.4). El primer paso del proceso, la **iniciación del tumor**, se considera que se debe a una alteración genética que provoca la proliferación anormal de una única célula. La proliferación celular da lugar a una población clonal de células tumorales. La **progresión del tumor** se produce a me-

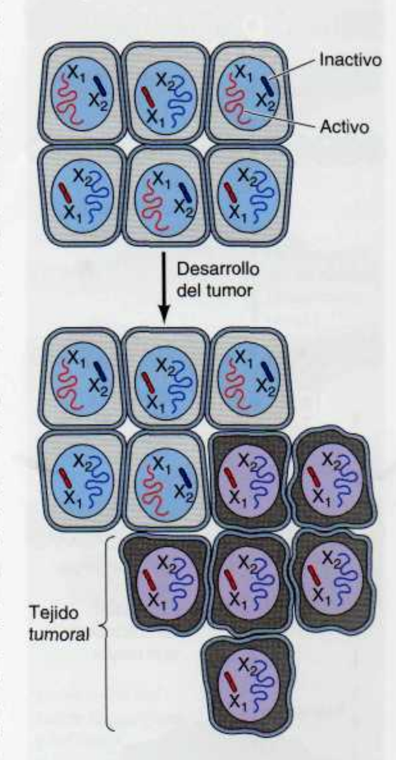
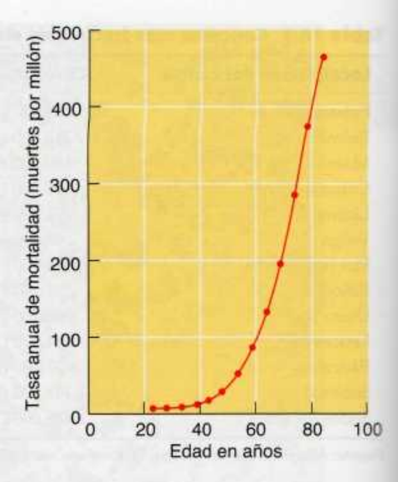
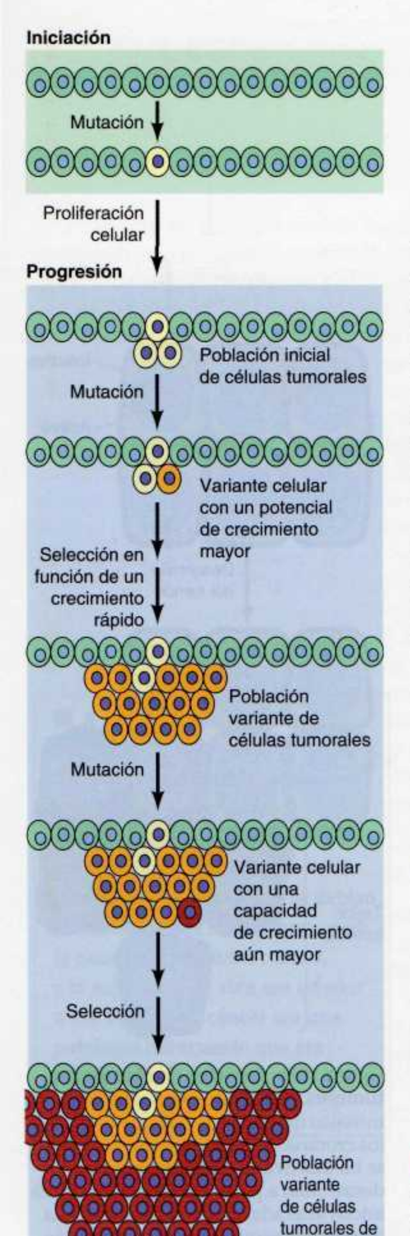


Figura 18.2 Carácter clónico de los tumores. Un tejido normal es un mosaico de células en las que uno de los cromosomas X diferentes (X_1 y X_2) se ha inactivado. Los tumores se desarrollan a partir de una única célula inicial alterada, por lo que cada célula tumoral mostrará el mismo patrón de inactivación de X (X_1 inactivo, X_2 activo).

Figura 18.3 Incremento de la tasa de cáncer de colon con la edad. Tasa de muertes anuales por cáncer de colon en Estados Unidos. (Datos a partir de J. Cairns, 1978. *Cancer: Science and Society*, New York: W.H. Freeman.)





dida que se producen mutaciones adicionales en las células de la población del tumor. Algunas de estas mutaciones confieren una ventaja selectiva a la célula, como por ejemplo, un crecimiento más rápido, y los descendientes de las células que portan dicha mutación dominarán en la población tumoral. Este proceso se denomina selección clonal, puesto que un nuevo clon de células tumorales ha evolucionado en función de su ritmo de crecimiento más rápido o de otras propiedades (como la supervivencia, invasión o metástasis) que le confieren una ventaja selectiva. La selección clonal continúa durante el desarrollo del tumor, por lo que los tumores cada vez crecen más deprisa y aumenta cada vez más su carácter maligno.

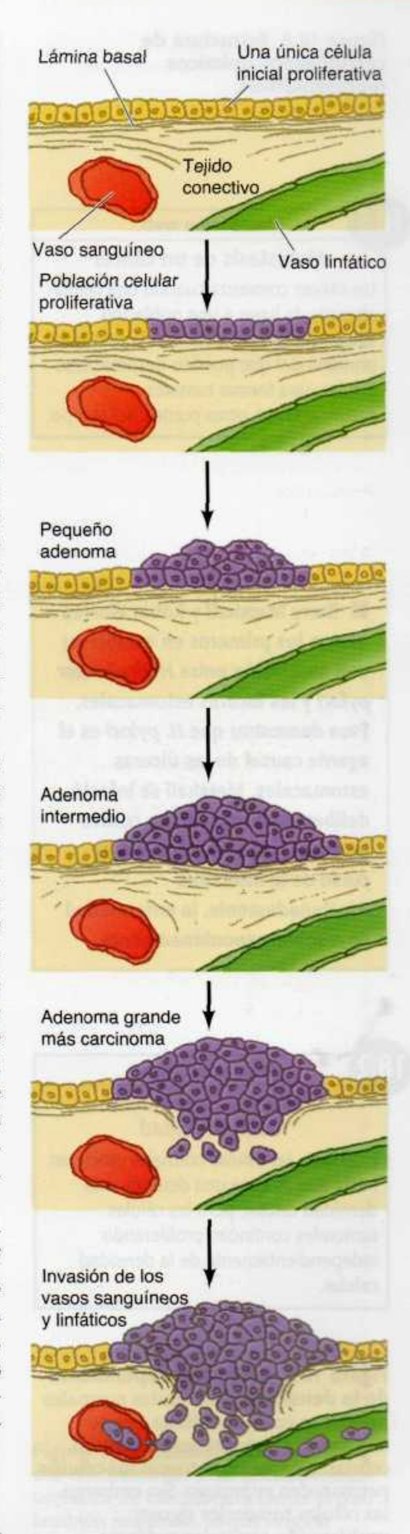
Los estudios de los carcinomas de colon proporcionan un claro ejemplo de la progresión tumoral durante el desarrollo de una alteración maligna humana común (Fig. 18.5). El primer estadio en el desarrollo del tumor es el aumento de la proliferación de las células epiteliales de colon. Una de las células de esta población en crecimiento dará lugar a una pequeña neoplasia benigna (un **adenoma** o **pólipo**). Posteriores rondas de selección clonal dan lugar al crecimiento de adenomas de un tamaño y potencial proliferativo cada vez mayor. Entonces surgen carcinomas malignos a partir de los adenomas benignos, lo cual se reconoce por la invasión de las células tumorales a través de la lámina basal hasta el tejido conectivo subyacente. A partir de aquí, las células cancerosas continúan proliferando y se propagan a través de los tejidos conectivos de la pared del colon. Finalmente, las células cancerosas atraviesan la pared del colon e invaden otros órganos abdominales, como la vejiga o el intestino delgado. Además, las células cancerosas invaden los vasos sanguíneos y linfáticos, lo que les permite formar metástasis por todo el cuerpo.

Causas del cáncer

Las sustancias que causan cáncer, denominadas **carcinógenos**, se han identificado mediante estudios en animales de experimentación y mediante análisis epidemiológicos de la frecuencia del cáncer en las poblaciones humanas (p. ej., la elevada incidencia de cáncer de pulmón entre los fumado-

Figura 18.4 Etapas del desarrollo de un tumor. El desarrollo de un cáncer se inicia cuando una única célula que ha sufrido una mutación comienza a proliferar de manera anormal. Mutaciones adicionales, a las que les sigue una selección de aquellas células de la población en función de su ritmo de crecimiento, dan lugar a la progresión del tumor caracterizado por un crecimiento más rápido y una mayor malignidad.

Figura 18.5 Desarrollo de carcinomas de colon. Una única célula alterada da lugar a una población celular proliferativa, que primero evoluciona a adenomas benignos de un tamaño cada vez mayor, y posteriormente a un carcinoma maligno. *Las células cancerosas invaden el tejido conectivo subyacente y penetran en los* vasos sanguíneos y linfáticos, distribuyéndose de esta manera por todo el cuerpo.



res). Puesto que el desarrollo del carácter maligno es un proceso multietapa complejo, son muchos los factores que pueden influir en el desarrollo del cáncer y, en la mayoría de los cánceres, es simplista hablar de una única causa. De todas maneras, se han encontrado muchos agentes, entre los que se incluyen la radiación, productos químicos y virus, que inducen cáncer tanto en animales de experimentación como en humanos.

La radiación y muchos carcinógenos químicos (Fig. 18.6) actúan dañando el ADN e induciendo mutaciones. Alguno de los carcinógenos que contribuyen a causar cánceres humanos son la radiación ultravioleta del sol (la principal causa de cáncer de piel), los productos químicos carcinógenos en el humo del tabaco, y la aflatoxina (un potente carcinógeno hepático producido por algunos mohos que contaminan reservas de cacahuetes y de otros tipos de grano almacenadas de forma inadecuada). Los carcinógenos en el humo del tabaco (incluyendo el benzo(*a*)pireno, la dimetilnitrosamina y los compuestos de níquel) son las principales causas identificadas de cáncer en el hombre. Fumar es la causa indiscutible de casi el 90% de los cánceres de pulmón, e igualmente está implicado en los cánceres de la cavidad oral, faringe, laringe, esófago y otras partes. En total, se estima que fumar es la causa de casi un tercio de todas las muertes por cáncer —una mortalidad impresionante para un único agente carcinógeno.

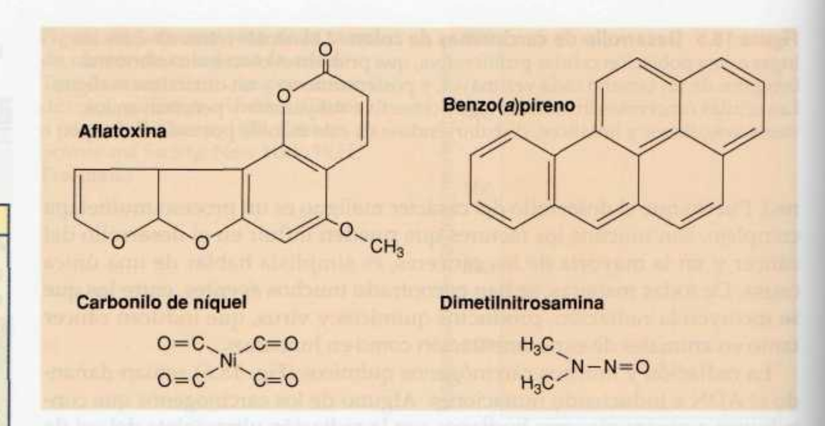
Otros carcinógenos contribuyen al desarrollo del cáncer estimulando la proliferación celular, en vez de induciendo mutaciones. Estos compuestos se denominan **promotores tumorales**, puesto que el incremento de la división celular que inducen se requiere para el desarrollo de una población celular proliferativa durante los primeros estadios del desarrollo del tumor. Las hormonas, particularmente los estrógenos, son importantes como promotores de tumores en el desarrollo de algunos cánceres humanos. Por ejemplo, la proliferación de las células del endometrio uterino es estimulada por los estrógenos, y la exposición a un exceso de estrógenos incrementa de manera significativa la posibilidad de que una mujer acabe desarrollando un cáncer de endometrio. Por tanto, la terapia basada en altas dosis de estrógenos durante largo tiempo para tratar la menopausia incrementa el riesgo de cáncer de endometrio. Afortunadamente este riesgo disminuye administrando progesterona para contrarrestar el efecto estimulador de los estrógenos en la proliferación celular en el endometrio. Sin embargo, la terapia durante largo tiempo basada en la combinación de estrógenos y progesterona puede incrementar el riesgo de cáncer de mama.

Algunos virus también son causantes de cáncer tanto en animales experimentales como en el hombre, y la infección con la bacteria *Helicobacter pylori* causa cáncer de estómago. Los cánceres humanos más comunes causados por virus incluyen el cáncer hepático y el carcinoma cervical, que juntos son responsables de entre el 10% y el 20% de las causas de cáncer en el hombre, pero como se analiza más adelante en este capítulo, los estudios de los virus tumorales han jugado un papel clave en la dilucidación de los eventos responsables del desarrollo de cánceres inducidos por carcinógenos tanto virales como no virales.

Propiedades de las células cancerosas

El crecimiento incontrolado de las células cancerosas se debe a la acumulación de alteraciones que afectan a muchos de los mecanismos de la regula-

Figura 18.6 Estructura de carcinógenos químicos representativos.



18.1 Animación web

Metástasis de un cáncer

Un cáncer comienza cuando una célula alterada da lugar a una población celular proliferativa, formando un tumor primario del que pueden desprenderse células para formar tumores secundarios en otros puntos del cuerpo.

Barry Marshall y Robin Warren fueron los primeros en establecer una asociación entre *Helicobacter pylori* y las úlceras estomacales. Para demostrar que *H. pylori* es el agente causal de las úlceras estomacales, Marshall se infectó deliberadamente con un cultivo puro del microbio y estudió el curso de la infección. Afortunadamente, la enfermedad se resolvió espontáneamente.

18.2 Animación web

Inhibición dependiente de la densidad

En cultivo, las células normales proliferan hasta que alcanza una determinada densidad celular, pero las células tumorales continúan proliferando independientemente de la densidad celular.

ción celular que se han visto en los capítulos anteriores. Esta relación se observa en muchos de los aspectos del comportamiento celular que diferencian a las células cancerosas de las células normales. Las células cancerosas manifiestan alteraciones en los mecanismos que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular normal. En conjunto, estas propiedades características de las células cancerosas permiten una descripción a nivel celular del carácter maligno.

Las células en cultivo simulan la proliferación incontrolada de las células cancerosas *in vivo*. Una primera diferencia entre las células cancerosas y las células normales en cultivo es que las células normales muestran una **inhibición de la proliferación dependiente de la densidad** (Fig. 18.7). Las células normales proliferan hasta alcanzar una densidad celular determinada, en función de la disponibilidad de los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo (normalmente en forma de suero). Entonces cesa su proliferación y permanecen en reposo, detenidas en la fase G_0 del ciclo celular (véase Fig. 16.5). Sin embargo, la proliferación de la mayoría de las células cancerosas no es sensible a esta inhibición dependiente de la densidad. En vez de responder a las señales que hacen que las células normales dejen de proliferar y entren en G_0, las células tumorales siguen creciendo hasta alcanzar una densidad elevada de células en cultivo, de la misma manera que ocurre con la proliferación incontrolada *in vivo*.

Una diferencia entre las células normales y las células cancerosas relacionada con lo anterior es que muchas células cancerosas requieren pocos factores de crecimiento extracelulares. Como ya se trató en el Capítulo 15, la

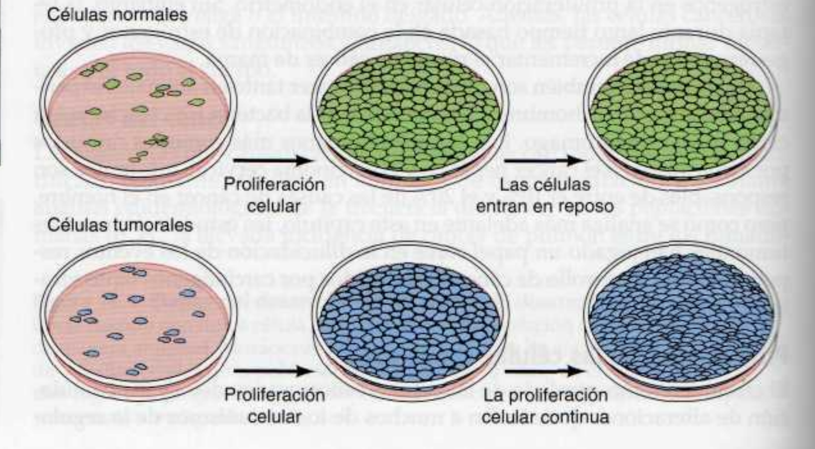


Figura 18.7 Inhibición dependiente de la densidad. Las células normales proliferan en cultivo hasta que se alcanza una determinada densidad celular; a partir de entonces las células permanecen en reposo. Sin embargo, las células tumorales siguen proliferando con independencia de la densidad celular alcanzada.

proliferación de la mayoría de las células se controla, al menos en parte, por factores de crecimiento polipeptídicos. Para algunos tipos celulares, especialmente los fibroblastos, la disponibilidad de los factores de crecimiento séricos es el principal determinante de su capacidad de crecimiento en cultivo. El requerimiento por parte de estas células de los factores de crecimiento está muy relacionado con el fenómeno de la inhibición dependiente de la densidad, puesto que la densidad a la que los fibroblastos normales entran en reposo es proporcional a la concentración de los factores de crecimiento séricos en el medio de cultivo.

En el caso de muchas células tumorales su necesidad de factores de crecimiento es mucho menor comparada con la de las células normales, lo que contribuye a la proliferación incontrolada de las células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. En algunos casos, las células cancerosas producen factores de crecimiento que estimulan su propia proliferación (Fig. 18.8). Esta producción anormal de un factor de crecimiento por parte de la célula conduce a la autoestimulación continua de la división celular (**estimulación autocrina del crecimiento**), por lo que las células cancerosas dependen en menor medida de los factores de crecimiento que provengan de otras fuentes fisiológicas normales. En otras ocasiones, las células cancerosas tienen un requerimiento reducido de factores de crecimiento debido a que los sistemas de señalización intracelular están alterados; es decir, no está regulada la actividad de los receptores de los factores de crecimiento o la de otras proteínas (p. ej., proteínas Ras o proteína quinasas) que se trataron en el Capítulo 15 como componentes de las vías de transducción de las señales que conducen a la proliferación celular.

La regulación de las células cancerosas mediante las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, también se produce de una manera menos rigurosa que en el caso de las células normales. La mayoría de las células cancerosas tiene menos capacidad de adhesión que las células normales, lo que es debido, generalmente, a una expresión reducida de las moléculas de adhesión de la superficie celular. Por ejemplo, la pérdida de la E-cadherina, la molécula de adhesión principal de las células epiteliales (véase Fig. 14.23), es un factor importante para el desarrollo de carcinomas (cánceres epiteliales). Debido a que las moléculas de adhesión celular tienen un bajo nivel de expresión, las células cancerosas están poco restringidas por las interacciones con otras células y con otros componentes tisulares, lo que proporciona

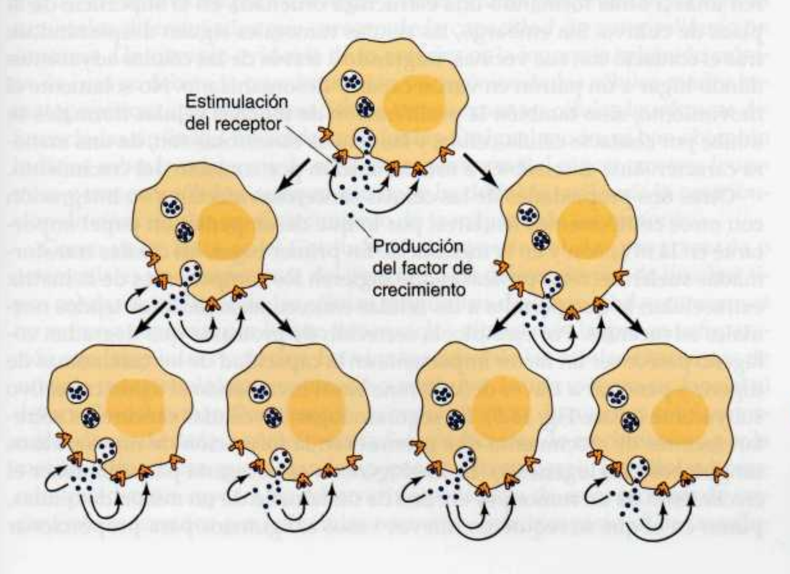
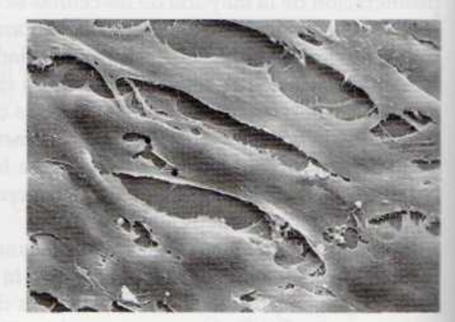


Figura 18.8 Estimulación autocrina del crecimiento. Una célula produce un factor de crecimiento frente al cual también responde, lo que origina la estimulación continua de la proliferación celular.

Figura 18.9 Inhibición por contacto. Micrografías al microscopio óptico (izquierda) y al microscopio electrónico de barrido (derecha), de fibroblastos normales y de células tumorales. La migración de los fibroblastos normales se inhibe mediante el contacto celular, por lo que se disponen ordenadamente, lado junto a lado, en la superficie de la placa de cultivo. Sin embargo, las células tumorales no se inhiben por contacto celular, por lo que migran unas sobre otras y se disponen de una manera desordenada formando una estructura en varias capas. (Cortesía de Lan Bo Chen, Dana-Farber Cancer Institute.)

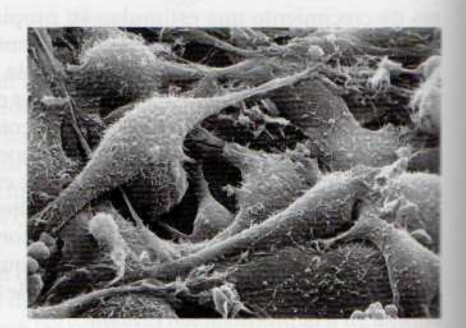
Células normales





Células tumorales





a las células malignas la capacidad de invadir y dar lugar a metástasis. La poca adhesividad de las células cancerosas también da lugar a alteraciones morfológicas y del citoesqueleto: muchas células tumorales son más redondeadas que las normales, en parte debido a que no se unen de una manera tan firme ni a la matriz extracelular ni a las células vecinas.

Una diferencia llamativa en las interacciones célula-célula entre las células normales y las células cancerosas se muestra en el fenómeno de la **inhibición por contacto** (Fig. 18.9). Los fibroblastos normales migran a través de la superficie de la placa de cultivo hasta que contactan con la célula vecina. Entonces se inhibe la migración celular, y las células normales se adhieren unas a otras formando una estructura ordenada en la superficie de la placa de cultivo. Sin embargo, las células tumorales siguen desplazándose tras el contacto con sus vecinas, migrando a través de las células adyacentes dando lugar a un patrón en varias capas y desorganizado. No solamente el movimiento, sino también la proliferación de muchas células normales se inhibe por contacto célula-célula, y las células cancerosas son, de una manera característica, insensibles a esta inhibición por contacto del crecimiento.

Otras dos propiedades de las células cancerosas afectan a su integración con otros componentes tisulares, por lo que desempeñan un papel importante en la invasión y en la metástasis. En primer lugar, las células transformadas suelen secretar proteasas que digieren los componentes de la matriz extracelular, lo que permite a las células cancerosas invadir los tejidos normales adyacentes. Por ejemplo, la secreción de proteasas que degradan colágeno parece ser un factor importante en la capacidad de los carcinomas de digerir y penetrar a través de la lámina basal invadiendo el tejido conectivo subyacente (véase Fig. 18.5). En segundo lugar, las células cancerosas secretan factores de crecimiento que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos (**angiogénesis**). La angiogénesis es necesaria para mantener el crecimiento de un tumor por encima de un tamaño de un millón de células, punto en el que se requieren nuevos vasos sanguíneos para proporcionar

oxígeno y nutrientes a las células tumorales en proliferación. Estos vasos sanguíneos se forman en respuesta a factores de crecimiento secretados por las células tumorales; éstos estimulan la proliferación de las células endoteliales de las paredes de los capilares en el tejido contiguo, lo que origina la extensión de nuevos capilares en el tumor (véase Fig. 17.15). La formación de estos nuevos vasos sanguíneos es importante no sólo para mantener el crecimiento del tumor, sino también en la metástasis. Las células tumorales pueden penetrar fácilmente en los nuevos capilares formados en respuesta a la estimulación angiogénica, lo que proporciona una nueva oportunidad para que las células cancerosas entren en el sistema circulatorio y comience el proceso de metástasis.

Otra característica general de la mayoría de las células cancerosas es que no se diferencian de manera normal. Esta diferenciación defectuosa se asocia a la proliferación anormal, puesto que, como ya se discutió en el Capítulo 17, la mayoría de las células diferenciadas o se dividen con muy poca frecuencia o no se dividen. Las células cancerosas en vez de llevar a cabo su programa de diferenciación normal, se bloquean en un estado temprano de diferenciación, lo que concuerda con su proliferación activa continua.

Las leucemias proporcionan un ejemplo particularmente bueno de la relación entre una diferenciación defectuosa y la característica de malignidad de estas células. Todos los tipos diferentes de células sanguíneas se derivan de una célula madre común de la médula ósea (véase Fig. 17.18). Los descendientes de estas células están determinados a seguir vías de diferenciación específicas. Por ejemplo, algunas células se diferencian para formar eritrocitos mientras que otras se diferencian para formar linfocitos, granulocitos o macrófagos. Las células progenitoras de cada uno de estos tipos sufren varias rondas de división a medida que se diferencian, pero una vez que se han diferenciado por completo, cesa la división celular. Por el contrario, las células leucémicas son incapaces de sufrir la diferenciación terminal (Fig. 18.10). En vez de ello, se detienen en los estadios tempranos de maduración manteniendo su capacidad de proliferación y siguen reproduciéndose.

Es posible que la proliferación de una subpoblación de células progenitoras de cáncer, en mayor medida que la proliferación continuada de todas las células tumorales, dirija el crecimiento de las leucemias y, posiblemente, algunos tumores sólidos. En este modelo, las células progenitoras del cáncer (al igual que las células progenitoras de los tejidos adultos normales; véase Fig. 17.17) se dividen para dar lugar a otras células progenitoras y a células tumorales diferenciadas que carecen de la capacidad de autoproliferación continua. Un ejemplo evidente de lo anterior es la leucemia mieloide crónica, la cual se debe a la transformación oncogénica de las células madre hematopoyéticas, que a continuación se transforman en células leucémicas diferenciadas de linajes mieloides y linfoides. De igual modo, se han obtenido indicios sobre la existencia de células progenitoras del cáncer en otras leucemias y tumores sólidos, aunque aún no se ha definido cuál sería la contribución de estas células en el crecimiento de la mayoría de los tumores.

Como ya se trató en el Capítulo 17, la **muerte celular programada** o **apoptosis** es un componente del programa de diferenciación de muchos tipos celulares, incluyendo las células sanguíneas. Muchas células cancerosas no sufren apoptosis, por lo que tienen ciclos vitales más largos en comparación con las células normales. Esta incapacidad de las células cancerosas de sufrir la muerte celular programada contribuye de una manera sustancial al desarrollo del tumor. Por ejemplo, la supervivencia de muchas células normales depende de las señales generadas por factores de crecimiento o por la matriz extracelular, que evitan la apoptosis. Sin embargo, las células tumorales pueden ser capaces de sobrevivir en ausencia de estos factores de crecimiento requeridos por las células normales. Esta incapacidad de las célu-

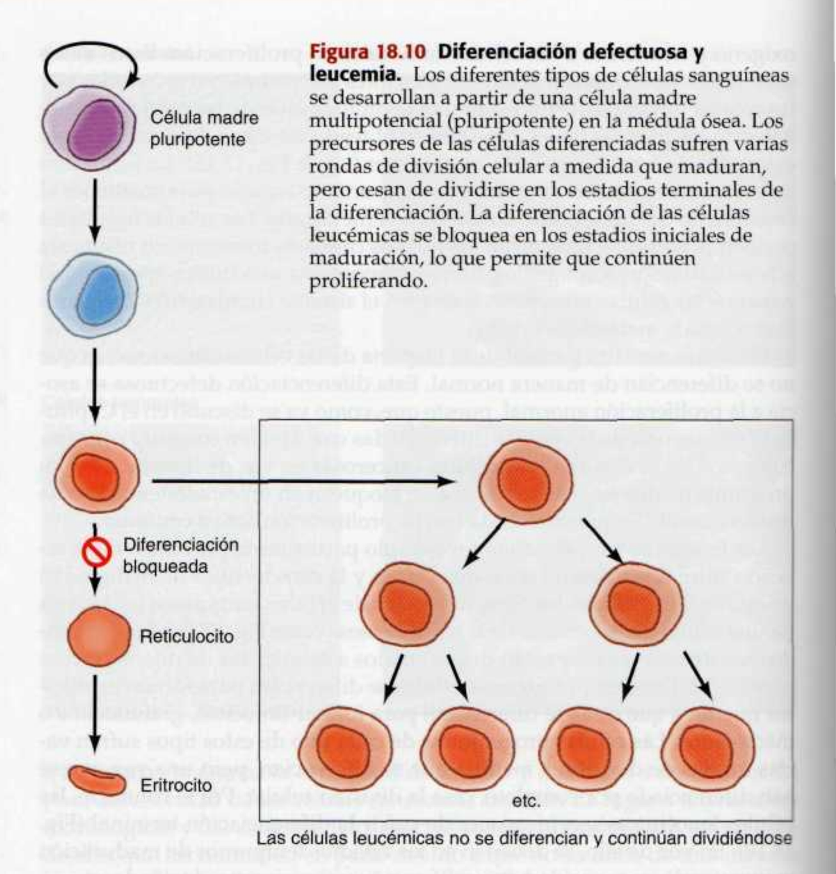


Figura 18.10 Diferenciación defectuosa y leucemia. Los diferentes tipos de células sanguíneas se desarrollan a partir de una célula madre multipotencial (pluripotente) en la médula ósea. Los precursores de las células diferenciadas sufren varias rondas de división celular a medida que maduran, pero cesan de dividirse en los estadios terminales de la diferenciación. La diferenciación de las células leucémicas se bloquea en los estadios iniciales de maduración, lo que permite que continúen proliferando.

las tumorales de sufrir apoptosis cuando se les priva de las señales ambientales normales puede ser importante no solamente para el desarrollo del tumor primario, sino también para la supervivencia y el crecimiento de las células metastásicas en otros tejidos. Las células normales también sufren apoptosis tras la lesión del ADN, mientras que esto no les sucede a las células cancerosas. En este caso, la incapacidad de sufrir apoptosis contribuye a que las células cancerosas sean resistentes a la radiación y a muchas drogas quimioterapéuticas, que actúan dañando el ADN. Además de evitar la apoptosis, las células cancerosas generalmente adquieren la capacidad de replicación ilimitada como resultado de la expresión de la telomerasa, que es necesaria para el mantenimiento los extremos de los cromosomas eucarióticos (véase Fig. 6.16). Por tanto, la supervivencia celular anómala así como la proliferación celular, desempeñan un papel fundamental en el crecimiento inexorable de las células cancerosas en el animal.

Transformación de las células en cultivo

Para poder estudiar la inducción de tumores por radiación, agentes químicos o virus se requieren sistemas experimentales en los que se puedan reproducir y cuantificar los efectos del agente carcinógeno. Aunque la actividad de los carcinógenos se pueda probar en los animales, estos experimentos son difíciles de cuantificar y de controlar. El desarrollo de los ensayos *in vitro* para detectar la conversión de las células normales en células tumorales en cultivo, un proceso denominado **transformación celular**, representó un avance fundamental en la investigación del cáncer. Estos ensayos se diseñan para detectar células transformadas, que muestran las ca-

racterísticas de crecimiento *in vitro* de las células tumorales, tras la exposición de un cultivo de células normales a un agente carcinógeno. Su aplicación ha permitido alcanzar un nivel de complejidad tal en el análisis de la transformación celular que no se hubiera alcanzado simplemente mediante los estudios en animales.

El primer ensayo de transformación celular y el más ampliamente utilizado es el ensayo focal, que lo desarrollaron Howard Temin y Harry Rubin en 1958. El ensayo focal se basa en la capacidad de reconocer un grupo de células transformadas como un «foco» diferenciado morfológicamente frente a un fondo de células normales en la superficie de una placa de cultivo (Fig. 18.11). El ensayo focal aprovecha tres propiedades de las células transformadas: la morfología alterada, la pérdida de la inhibición por contacto y la pérdida de la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad. El resultado es que se forma una colonia de células transformadas, morfológicamente alteradas, que crecen por encima de un fondo de células normales en el cultivo. Estos focos de células transformadas pueden detectarse y cuantificarse en una semana o dos tras la exposición a un agente carcinógeno. En general, las células transformadas *in vitro* son capaces de generar tumores tras su inoculación en animales, lo que confirma a la transformación *in vitro* como un indicador válido de la formación de células cancerosas.



Figura 18.11 Ensayo focal. Un foco de fibroblastos de embrión de pollo inducido por el virus del sarcoma de Rous. (A partir de H.M. Temin y H. Rubin, 1958. *Virology* 6: 669.)

Virus tumorales

Los miembros de seis familias diferentes de virus animales, denominados **virus tumorales**, son capaces de causar cáncer directamente tanto en animales de experimentación como en humanos (Tabla 18.2). Los virus que causan cáncer en humanos incluyen los virus de la hepatitis B y C (cáncer hepático), los papilomavirus (cáncer cervical y otros anogenitales), virus de Epstein-Barr (linfoma de Buritt y carcinoma nasofaríngeo), herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (sarcoma de Kaposi) y virus linfotrópico de células T humanas (leucemia de células T adultas). Adicionalmente, el VIH es indirectamente responsable de los cánceres que se desarrollan en pacientes de SIDA como consecuencia de la inmunodeficiencia.

Como ya se comentó, los virus tumorales no sólo son causas importantes de enfermedades humanas sino que también han desempeñado un papel crítico en la investigación del cáncer al servir como modelos para los estudios celulares y moleculares de la transformación celular. El pequeño tamaño de sus genomas ha hecho que los virus tumorales se puedan analizar molecularmente, lo que ha permitido identificar genes virales responsables de la inducción del cáncer, y lo que ha facilitado nuestra comprensión actual del cáncer a nivel molecular.

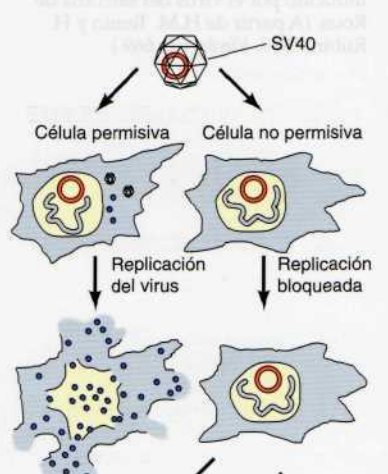
Tabla 18.2 Virus tumorales

Familia de virus	Tumores humanos	Tamaño del genoma (kb)
Virus de ADN tumorales		
Virus de la hepatitis B	Cáncer de hígado	3
SV40 y poliomavirus	Ninguno	5
Papilomavirus	Carcinoma cervical	8
Adenovirus	Ninguno	35
Herpesvirus	Linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo, sarcoma de Kaposi	100–200
Virus de ARN tumorales		
Virus de la hepatitis C	Cáncer de hígado	10
Retrovirus	Leucemia de las células T de adultos	9–10

Virus de la hepatitis B y C

Los virus de la **hepatitis B** y **C** son los principales causantes del cáncer hepático, que es la tercera causa de muertes por cáncer en el mundo. Los virus de la hepatitis B y C infectan específicamente células hepáticas y pueden dar lugar a infecciones crónicas del hígado de larga duración. Dichas infecciones crónicas están asociadas con un alto riesgo de padecer un cáncer hepático, que finalmente se desarrolla en un 10%-20% de las personas con infecciones crónicas por hepatitis B y en un 5 % de las personas crónicamente infectadas con el virus de la hepatitis C.

Los mecanismos moleculares por los que los virus de la hepatitis causan el cáncer hepático todavía son desconocidos. El virus de la hepatitis B es un virus ADN con un genoma de tan solo 3 kb. La transformación celular por el virus de la hepatitis B puede estar mediada por una proteína (denominada HBx) que interacciona con la proteína supresora tumoral p53 y que afecta a la expresión de varios genes celulares que dirigen la proliferación celular. Adicionalmente, el desarrollo de los cánceres inducidos por el virus de la hepatitis B está dirigido por la proliferación continua de las células hepáticas que resulta del daño e inflamación tisular crónicos. El virus de la hepatitis C es un virus ARN con un genoma de aproximadamente 10 kb. La proliferación celular en respuesta a una inflamación crónica es una de las principales contribuciones al desarrollo de cáncer en personas crónicamente infectadas por el virus de la hepatitis C, a pesar de que también es posible que algunas proteínas del virus de la hepatitis C estimulen directamente la proliferación de las células hepáticas infectadas.



SV40 y poliomavirus

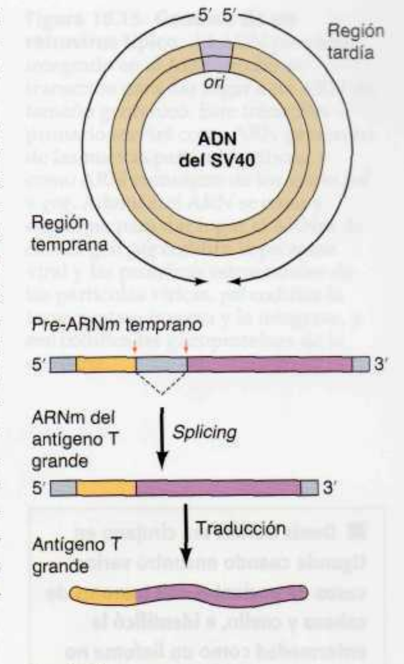
Aunque ni el **virus de simio 40** (**SV40**) ni los **poliomavirus** están relacionado con el cáncer en humanos, han resultado fundamentales como modelos para comprender la base molecular de la transformación celular. La utilidad de estos virus en la investigación del cáncer proviene de la disponibilidad de cultivos celulares adecuados tanto para la replicación del virus como para la transformación, así como del pequeño tamaño de sus genomas (aproximadamente 5 kb).

El SV40 y el poliomavirus no inducen tumores ni transforman células en sus especies hospedadoras naturales —monos y ratones respectivamente—. En las células de sus hospedadores naturales (células permisivas), la infección conduce a la replicación del virus, a la lisis celular, y a la liberación de una progenie de partículas del virus (Fig. 18.12). Puesto que una célula permisiva muere debido

transfección de las células con ADNc de proteínas individuales de la región temprana muestra que, en el caso del SV40, el antígeno T grande es suficiente para inducir la transformación, mientras que en el caso del poliomavirus el principal responsable de la transformación es el antígeno T mediano.

Durante la infección lítica, estas proteínas de la región temprana llevan a cabo múltiples funciones que se requieren para la replicación del virus. Por ejemplo, el antígeno T del SV40 se une al origen del ADN de SV40 e inicia la replicación del ADN vírico (véase Cap. 6). Además, las proteínas de la región temprana de SV40 y del poliomavirus activan la expresión génica y la síntesis del ADN de la célula huésped. Puesto que la replicación del virus depende de las enzimas de la célula huésped (p. ej., ADN polimerasa), esta activación de la célula huésped es un suceso crítico en el ciclo vital del virus. La mayoría de las células del animal no proliferan, por lo que su división ha de ser activada para producir los enzimas necesarios para la replicación del ADN viral. Esta activación de la proliferación celular por parte de los productos génicos tempranos, puede producir la transformación si el ADN viral se integra de manera estable y se expresa en una célula no permisiva.

Como se tratará posteriormente en este capítulo, las proteínas de la región temprana del SV40 y del poliomavirus inducen la transformación mediante la interacción con las proteínas del huésped que regulan la proliferación celular. Por ejemplo, el antígeno T de SV40 se une e inactiva a las proteínas supresoras de tumores Rb y p53 de la célula huésped, que son reguladores clave de la proliferación y supervivencia celular.



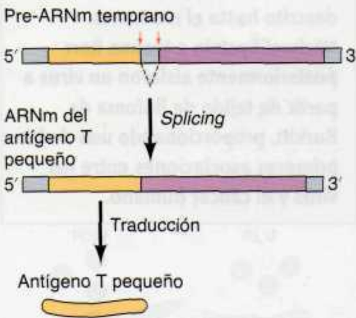


Figura 18.13 Genoma del SV40. El genoma se estructura en una región temprana y en una región tardía. Los antígenos T grande y pequeño se producen mediante un *splicing* alternativo de un pre-ARNm de la región temprana.

Papilomavirus

Los **papilomavirus** son pequeños virus de ADN (genomas de aproximadamente 8 kb) que inducen tumores tanto benignos como malignos en humanos y en otras especies animales. Se han identificado aproximadamente 100 tipos diferentes de papilomavirus humanos, que infectan las células epiteliales de diferentes tejidos. Algunos de estos virus causan únicamente tumores benignos (como las verrugas), mientras que otros son agentes causantes de carcinomas malignos, particularmente cáncer cervical y otros cánceres anogenitales. La mortalidad por cáncer cervical es relativamente baja en Estados Unidos, debido en gran parte a la detección precoz y al tratamiento que son posibles gracias a la técnica de Papanicolaou. Sin embargo, en otras partes del mundo el cáncer cervical es frecuente; es el segundo cáncer más prevalente en la mujer y es el responsable del 5% al 10% de la incidencia mundial del cáncer.

La transformación celular por los papilomavirus humanos se debe a la expresión de dos genes tempranos, *E6* y *E7* (Fig. 18.14). Las proteínas E6 y E7 actúan de manera similar a como lo hace el antígeno T de SV40 interfiriendo con la función de las proteínas celulares Rb y p53. Concretamente, E7 se une a Rb, y E6 activa la degradación de p53 por una proteólisis mediada por ubiquitinas.

La prueba de Pap fue desarrollada por George Papanicolaou en los años 1930. Se recogen células uterinas y se realiza un frotis sobre un portaobjetos. Puesto que las células cancerosas poseen una morfología alterada pueden detectarse fácilmente mediante el examen microscópico.

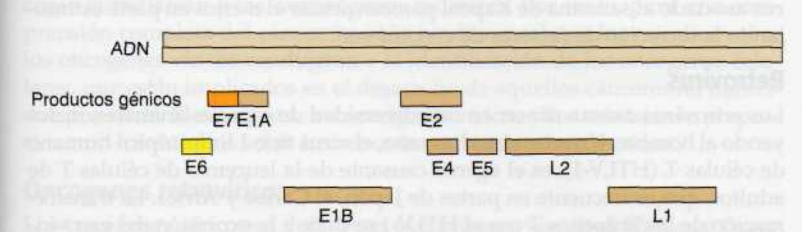


Figura 18.14 Genoma de un papilomavirus humano. Los productos génicos se designan como E (*early*-tempranos) y L (*late*-tardíos). La transformación se debe a la acción de E6 y de E7.

Adenovirus

Los **adenovirus** son una familia grande de virus de ADN con genomas de 35 kb, aproximadamente. A diferencia de los papilomavirus, los adenovirus no están relacionados con la aparición de cánceres ni en humanos ni en otros animales. Sin embargo, son ampliamente estudiados y son modelos importantes en la biología experimental del cáncer.

Al igual que el SV40 y los poliomavirus, los adenovirus causan la lisis en las células de sus especies hospedadoras naturales, pero pueden inducir la transformación en aquellos hospedadores no permisivos. La transformación por los adenovirus se debe a la expresión de dos genes tempranos, *E1A* y *E1B*, que se requieren para la replicación del virus en las células permisivas. Estas proteínas transformadoras inactivan las proteínas supresoras de tumores Rb y p53; E1A se une a Rb y E1B se une a p53. Por tanto, parece ser que el SV40, los papilomavirus y los adenovirus inducen la transformación a través de una vía común, alterando la regulación del ciclo celular debido a la interferencia con las actividades de Rb y p53.

Herpesvirus

Los **herpesvirus** se encuentran entre los virus animales más complejos, con genomas de 100 a 200 kb. Varios herpesvirus inducen tumores en especies animales, entre las que se incluyen ranas, pollos y monos. Además, dos miembros de la familia de los herpesvirus, el **herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi** y el **virus de Epstein-Barr**, son causantes de cánceres humanos. El herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi desempeña un papel crítico en el desarrollo del sarcoma de Kaposi, y el virus de Epstein-Barr se ha relacionado con varios cánceres humanos, entre los que se incluyen el linfoma de Burkitt en algunas regiones de África, los linfomas de células B en pacientes con sida y otros individuos inmunodeprimidos, y el carcinoma nasofaríngeo en China.

■ **Denis Burkitt era cirujano en Uganda cuando encontró varios casos de pacientes con tumores de cabeza y cuello, e identificó la enfermedad como un linfoma no descrito hasta el momento. Michael Epstein e Ivonne Barr posteriormente aislaron un virus a partir de tejido de linfoma de Burkitt, proporcionando una de las primeras asociaciones entre los virus y el cáncer humano.**

Además de su asociación con estos cánceres humanos, el virus de Epstein-Barr es capaz de transformar linfocitos B humanos en cultivo. Sin embargo, debido en parte a la complejidad de su genoma, la biología molecular de la replicación y de la transformación del virus de Epstein-Barr todavía no se ha comprendido en su totalidad. La principal proteína transformante del virus de Epstein-Barr (LMP1) imita a un receptor de superficie celular en los linfocitos B y funciona activando las vías de señalización que estimulan la proliferación celular e inhiben la apoptosis. Otros varios genes víricos pueden también contribuir a la transformación de linfocitos, pero sus funciones en el proceso de transformación no han sido establecidas.

El herpesvirus de ADN asociado al sarcoma de Kaposi se encuentra regularmente en células del sarcoma de Kaposi, y en estos tumores. Una característica importante de las células del sarcoma de Kaposi es que secretan una diversidad de citoquinas y factores de crecimiento que dirigen el desarrollo tumoral. Curiosamente, las proteínas transformantes del herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi parecen actuar al menos en parte estimulando la secreción de factores de crecimiento.

Retrovirus

Los **retrovirus** causan cáncer en una diversidad de especies animales, incluyendo al hombre. Un retrovirus humano, el virus tipo 1 linfotrópico humano de células T (HTLV-1), es el agente causante de la leucemia de células T de adultos, que es frecuente en partes de Japón, el Caribe y África. La transformación de los linfocitos T por el HTLV-1 se debe a la expresión del gen vírico *tax*, que codifica una proteína reguladora que afecta a la expresión de varios genes que controlan el crecimiento celular. El sida está causado por otro retrovirus, el IV. A diferencia del HTLV-1, el IV no causa cáncer de manera

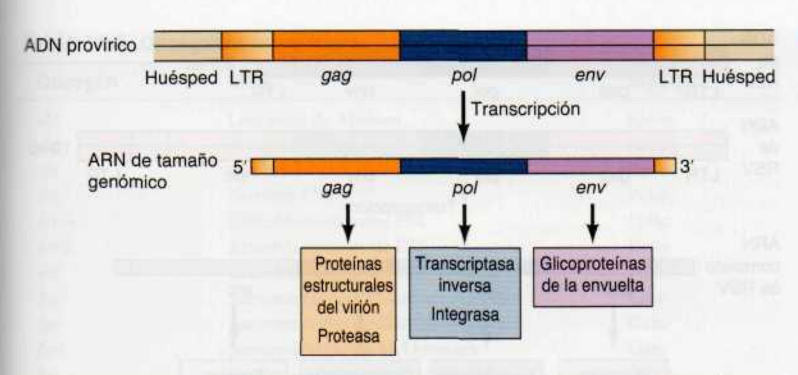


Figura 18.15 Genoma de un retrovirus típico. El ADN provírico integrado en el ADN celular se transcribe para dar lugar a un ARN de tamaño genómico. Este tránscrito primario servirá como ARN genómico de las nuevas partículas víricas, y como ARN mensajero de los genes *pol* y *gag*. Además, el ARN se corta y empalma para dar lugar al ARNm de *env*. El gen *gag* codifica la proteasa viral y las proteínas estructurales de las partículas víricas, *pol* codifica la transcriptasa inversa y la integrasa, y *env* codifica las glicoproteínas de la envuelta.

directa convirtiendo una célula normal en una célula tumoral. Sin embargo, los pacientes de sida sufren una elevada incidencia de algunos cánceres, particularmente linfomas y el sarcoma de Kaposi. Estos cánceres, que también son frecuentes en otros individuos inmunodeprimidos, están asociados con la infección por otros virus (p. ej., el virus de Epstein-Barr y el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi), y parece ser que se desarrollan como una consecuencia secundaria de la inmunosupresión en los pacientes con sida.

Los distintos retrovirus difieren de manera sustancial en su potencial oncogénico. La mayoría de los retrovirus sólo contienen tres genes (*gag*, *pol* y *env*) que son necesarios para la replicación del virus, pero que no desempeñan ningún papel en la transformación celular (Fig. 18.15). Este tipo de retrovirus raramente induce tumores como consecuencia de las mutaciones debidas a la integración del ADN provírico dentro de los genes celulares, o junto a éstos.

Sin embargo, otros retrovirus contienen genes específicos que inducen la transformación celular y son potentes carcinógenos. El prototipo de estos retrovirus altamente oncogénicos es el **virus del sarcoma de Rous (RSV)**, que se aisló, por primera vez, en un sarcoma de pollo por Peyton Rous en 1911. Más de 50 años después, los estudios sobre el RSV condujeron a la identificación del primer oncogén vírico, lo que ha proporcionado un modelo para comprender muchas características del desarrollo de los tumores a nivel molecular.

Oncogenes

El cáncer se debe a las alteraciones en determinados genes reguladores que controlan la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular. Los estudios sobre los virus tumorales revelaron que unos genes específicos (denominados **oncogenes**) eran capaces de inducir la transformación celular, lo que proporcionó una primera aproximación a las bases moleculares del cáncer. Sin embargo, la mayoría de los cánceres humanos (aproximadamente el 80%) no son inducidos por virus y surgen debido a otras causas, como la radiación y los carcinógenos químicos. Por tanto, para una comprensión completa del cáncer, ha sido fundamental que los estudios sobre los oncogenes víricos condujeran a la identificación de los oncogenes celulares, que están implicados en el desarrollo de aquellos cánceres no inducidos por virus. El nexo entre los oncogenes víricos y los celulares lo proporcionaron los estudios sobre los retrovirus altamente oncogénicos.

Oncogenes retrovíricos

Los oncogenes víricos se definieron por primera vez en el RSV, que transforma a los fibroblastos de embrión de pollo en cultivo e induce grandes sarcomas una o dos semanas después de haber sido inoculado en pollos (Fig. 18.16). Por el contrario, el virus de la leucosis aviar (ALV), que está em-

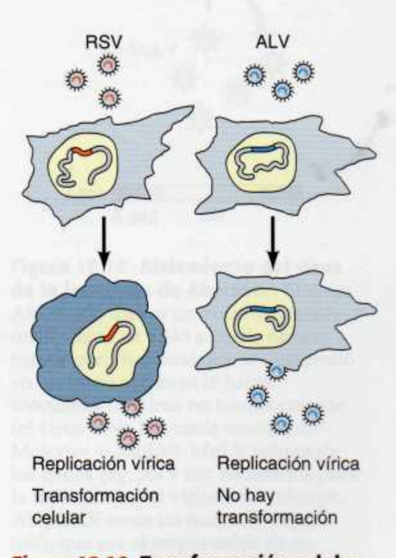


Figura 18.16 Transformación celular por el RSV y por el ALV. Tanto el RSV como el ALV infectan y se replican en los fibroblastos de embrión de pollo, pero sólo el RSV induce la transformación celular.

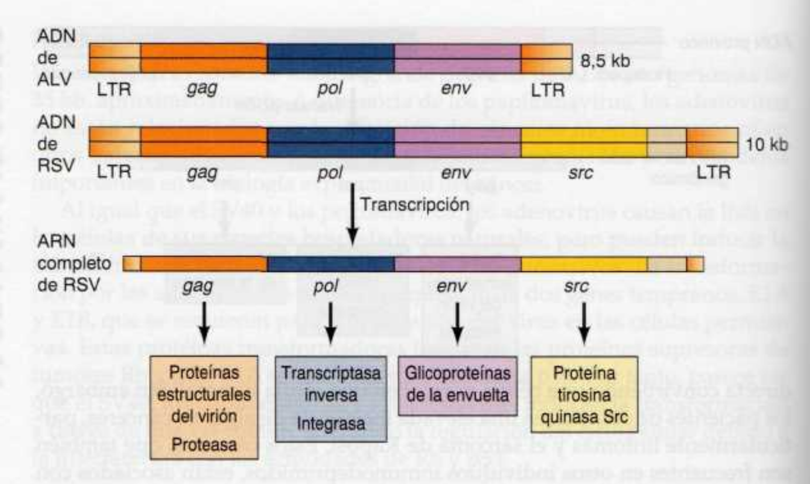


Figura 18.17 Genoma del RSV. El RSV contiene un gen adicional, *src*, que no está presente en el ALV, y que codifica la proteína-tirosina quinasa Src.

parentado con el anterior, se replica en las mismas células que el RSV pero *no induce su transformación. Esta diferencia en el potencial transformador* sugería que el RSV podía contener información genética específica responsable de la transformación de las células infectadas. Una comparación directa de los genomas del RSV y del ALV apoyaba esta hipótesis: el ARN genómico del RSV tenía cerca de 10 kb, mientras que el del ALV era más pequeño, aproximadamente 8,5 kb.

A principios de los años 70, Peter Vogt y Steven Martin aislaron mutantes de deleción y mutantes sensibles a la temperatura del RSV, que eran incapaces de inducir la transformación. Sin embargo, estos mutantes se podían replicar normalmente en las células infectadas, lo que indica que el RSV contiene información genética necesaria para la transformación pero no para la replicación del virus. A partir del análisis de los mutantes de deleción y de los mutantes sensibles a la temperatura se caracterizó un único gen responsable de la capacidad del RSV de inducir tumores en aves y de transformar los fibroblastos en cultivo. Puesto que el RSV provoca *sarcomas*, su oncogén se denominó *src*. El gen *src* es un añadido al genoma del RSV; no está presente en el ALV (Fig. 18.17). Codifica una proteína de 60 kDa que fue la primera proteína-tirosina quinasa identificada (véase experimento clave en el Cap. 15).

Se han aislado más de 40 retrovirus diferentes altamente oncogénicos, a partir de varios animales, incluyendo pollos, pavos, ratones, ratas, gatos y monos. Todos estos virus, al igual que el RSV, contienen al menos un oncogén (en algunos casos dos) que no es necesario para la replicación del virus pero que es el responsable de la transformación celular. En algunos casos, virus diferentes contienen los mismos oncogenes, pero se han identificado más de dos docenas de oncogenes distintos en estos virus (Tabla 18.3). Al igual que *src*, muchos de estos genes (como por ejemplo *ras* y *raf*) codifican proteínas que ahora se sabe que son componentes de las vías de señalización que activan la proliferación celular (véase Fig. 15.34).

Proto-oncogenes

Una característica inesperada de los oncogenes retrovíricos es que no están involucrados en la replicación del virus. Puesto que la mayoría de los virus están diseñados para replicarse de la manera más eficaz posible, la existencia de oncogenes virales que no son una parte integrante del ciclo vital del virus, supone una paradoja. Por tanto, los científicos se vieron obligados a preguntarse de dónde procedían los oncogenes retrovíricos y cómo se habían incorporado a los genomas virales —una línea de investigación que permitió identificar los oncogenes celulares en los cánceres humanos.

Tabla 18.3 Oncogenes retrovíricos

Oncogén	Virus	Especie
abl	Leucemia de Abelson	Ratón
akt	Virus AKT8	Ratón
cbl	Cas NS-1	Ratón
crk	Sarcoma CT10	Pollo
*erb*A	Eritroblastosis aviar ES4	Pollo
*erb*B	Eritroblastosis aviar ES4	Pollo
ets	Eritroblastosis aviar E26	Pollo
fes	Sarcoma felino de Gardner-Arnstein	Gato
fgr	Sarcoma felino de Gardner-Rasheed	Gato
fms	Sarcoma felino de McDonough	Gato
fos	Sarcoma osteogénico murino FBJ	Ratón
fps	Sarcoma de Fujinami	Pollo
jun	Sarcoma aviar 17	Pollo
kit	Sarcoma felino de Hardy-Zuckerman	Gato
maf	Sarcoma aviar AS42	Pollo
mos	Sarcoma de Moloney	Ratón
mpl	Leucemia mieloproliferativa	Ratón
myb	Mieloblastosis aviar	Pollo
myc	Mielocitomatosis aviar	Pollo
p3k	Sarcoma aviar 16	Pollo
qin	Sarcoma aviar 31	Pollo
raf	Sarcoma murino 3611	Ratón
*ras*H	Sarcoma de Harvey	Rata
*ras*K	Sarcoma de Kirsten	Rata
rel	Reticuloendoteliosis	Pavo
ros	Sarcoma UR2	Pollo
sea	Eritroblastosis aviar S13	Pollo
sis	Sarcoma de simio	Mono
ski	SK aviar	Pollo
src	Sarcoma de Rous	Pollo
yes	Sarcoma Y73	Pollo

La primera pista acerca del origen de los oncogenes la proporcionó la manera de aislar los virus altamente oncogénicos. El aislamiento del virus de la leucemia de Abelson es un ejemplo típico (Fig. 18.18). Se inocularon más de 150 ratones con un virus no transformante que contenía solamente los genes *gag*, *pol* y *env* necesarios para la replicación del virus. Uno de estos ratones desarrolló un linfoma a partir del cual se aisló un nuevo virus altamente oncogénico (el virus de la leucemia de Abelson), que ahora contenía un oncogén (*abl*). Se sugirió la hipótesis de que los oncogenes retrovíricos procedían de genes de la célula huésped, y que ocasionalmente este gen se incorporaba al genoma vírico, dando lugar a un nuevo virus altamente oncogénico como resultado de un proceso de recombinación virus-huésped.

La propuesta clave de esta hipótesis era que las células normales contenían genes que estaban relacionados con los oncogenes retrovíricos. Esto se demostró definitivamente en 1976 por Harold Varmus, J. Michael Bishop y cols., que demostraron que una sonda de ADNc para el oncogén *src* del SRV hibridaba con secuencias relacionadas en el ADN de células normales de pollo. Más aún, se encontraron secuencias relacionadas con *src* en los ADN normales de un amplio grupo de vertebrados (incluidos los humanos), por lo que parecía que se habían conservado en la evolución. Experimentos similares con sondas para los oncogenes de otros retrovirus altamente oncogénicos han dado resultados similares, y actualmente está establecido que los oncogenes retrovíricos derivan de genes similares de células normales.

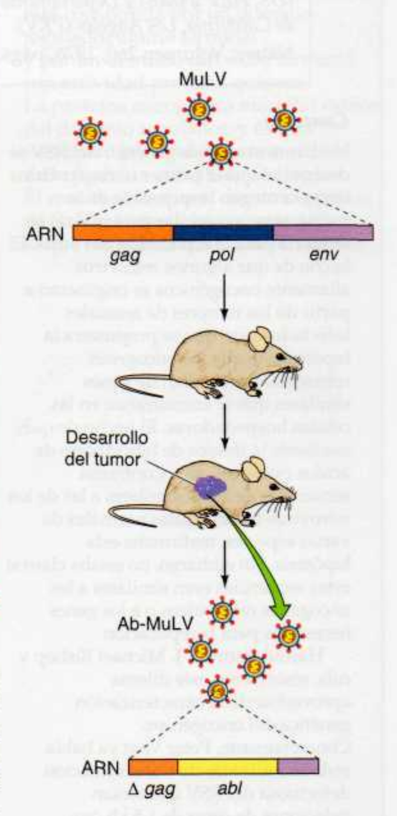


Figura 18.18 Aislamiento del virus de la leucemia de Abelson. El virus Ab-MuLV, que es un virus altamente oncogénico, se aisló a partir de un tumor poco habitual que se desarrolló en un ratón al que se le había inoculado un virus no transformante (el virus de la leucemia murina de Moloney, o MuLV). MuLV solo tenía los genes *gag*, *pol* y *env* necesarios para la replicación del virus. Sin embargo, Ab-MuLV tenía un nuevo oncogén (*abl*), que era el responsable de su actividad transformante. El oncogén *abl* sustituía a algunos de los genes de la replicación del virus y se encontraba en el genoma de Ab-MuLV unido a un gen *gag* que tenía una deleción (se denominó Δ *gag*).



EXPERIMENTO CLAVE

Descubrimiento de los proto-oncogenes

Un ADN relacionado con el(los) gen(es) transformante(s) del virus del sarcoma aviar se encuentra en el ADN de las aves sanas

Dominique Stehelin, Harold. E. Varmus, J. Michael Bishop y Peter K. Vogt
Departamento de microbiología, Universidad de California, San Francisco (DS, HEV y JMB) y Departamento de Microbiología, Universidad de California, Los Ángeles (PKV)

Nature, Volumen 260, 1976, págs. 170-173



J. Michael Bishop



Harold Varmus

Contexto

Mediante el análisis genético del RSV se determinó que el primer oncogén vírico (*src*) era un gen responsable de la transformación celular pero que no se requería para la replicación del virus. El hecho de que algunos retrovirus altamente oncogénicos se originaran a partir de los tumores de animales infectados hizo que se propusiera la hipótesis de que los oncogenes retrovíricos procedían de genes similares que se encontraban en las células hospedadoras. El hecho de que, mediante la técnica de hibridación de ácidos nucleicos, se encontraran secuencias de ADN similares a las de los retrovirus en las células normales de varias especies, reafirmaba esta hipótesis. Sin embargo, no estaba claro si estas secuencias eran similares a los oncogenes retrovíricos o a los genes necesarios para la replicación.

Harold Varmus, J. Michael Bishop y cols. resolvieron este dilema aprovechando la caracterización genética del oncogén *src*. Concretamente, Peter Vogt ya había aislado mutantes de transformación defectuosa del RSV que tenían deleciones de cerca de 1,5 kb que correspondían a casi todo o a todo el gen *src*. Stehelin y cols. prepararon una sonda de ADNc para secuencias específicas de *src*. La utilización de esta sonda en experimentos de hibridación de ácidos nucleicos les permitió demostrar de manera definitiva que las células normales contienen secuencias de ADN similares a *src*.

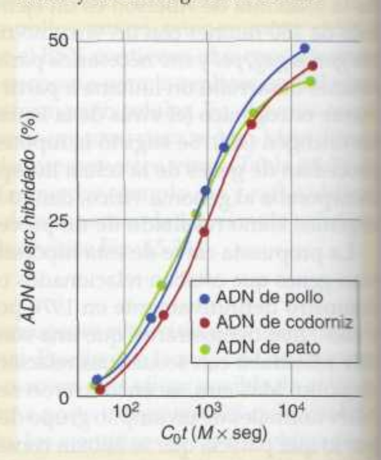
Experimento

En primer lugar, se utilizó la transcriptasa inversa para sintetizar una sonda de ADNc radiactivo, constituido por cortos fragmentos de ADN monocatenario complementarios al ARN genómico del RSV. Esta sonda se hibridó a un exceso de ARN purificado a partir de un mutante de deleción de transformación defectuosa. Los fragmentos de ADNc que eran complementarios a los genes virales de la replicación se hibridaron al ARN del RSV de transformación defectuosa, formándose moléculas de heterodúplex ARN-ADN. Por el contrario, los fragmentos de ADNc que eran complementarios a *src* no se hibridaron y permanecieron como una única cadena. Entonces se aisló este ADN monocatenario para generar una sonda específica de la secuencia oncogénica *src*. Tal y como se había predicho a través del tamaño de las deleciones en los mutantes de transformación defectuosa de RSV, la sonda específica de *src* era homóloga a un fragmento de cerca de 1,5 kb del ARN de RSV.

A continuación, el ADNc de *src* radiactivo se utilizó como una sonda de hibridación para detectar secuencias de ADN similares en células de ave normales. De manera sorprendente, el ADNc de *src* se hibridó con el ADN de pollos normales así como con el ADN de otras especies de aves (véase figura). De esta manera, estos experimentos demostraron que las células normales contenían secuencias de ADN que estaban íntimamente relacionadas con el oncogén *src*, lo que apoyaba la hipótesis de que los oncogenes retrovíricos se originaban a partir de genes celulares que se incorporaban al genoma del virus.

Impacto

El artículo de Stehelin y cols. publicado en 1976 finalizaba proponiendo la posibilidad de que «las secuencias celulares *src* intervengan en la regulación del desarrollo y del crecimiento de las células normales, o en la transformación del comportamiento celular debida a agentes físicos, químicos o virales». Esta propuesta ha sido confirmada, y el descubrimiento de las secuencias celulares *src* abrió las puertas a la comprensión de la regulación de la proliferación de las células normales y de la base molecular del cáncer humano. Los estudios de las proteínas oncogénicas y proto-oncogénicas, incluyendo a la propia Src, han resultado ser fundamentales para desentrañar las vías de señalización que controlan la proliferación y diferenciación de las células normales. El descubrimiento del proto-oncogén *src* sugería aún más que los tumores no inducidos por virus se podían generar debido a mutaciones en genes celulares similares, lo que condujo directamente al descubrimiento de los oncogenes en los tumores humanos. Los resultados de Varmus, Bishop y cols. supusieron la unificación de los estudios sobre los virus tumorales, sobre las células normales y sobre los tumores no inducidos por virus; esto implica que han afectado a prácticamente todos los aspectos de la investigación sobre el cáncer y sobre la regulación celular.



Hibridación del ADNc específico de *src* con el ADN de pollo, codorniz y pato normales.

Los genes de las células normales a partir de los cuales se originan los oncogenes retrovíricos se denominan **proto-oncogenes**. Son genes reguladores importantes ya que en muchos casos codifican proteínas que intervienen en las vías de la transducción de señales que controlan la proliferación celular normal (p. ej., *src*, *ras* y *raf*). Los oncogenes son formas de sus correspondientes proto-oncogenes que se expresan de manera anormal o que han mutado. Debido a estas alteraciones, los oncogenes inducen una proliferación celular anormal y el desarrollo del tumor.

Un oncogén que se incorpora en un genoma retrovírico difiere en varios aspectos de su correspondiente proto-oncogén. En primer lugar, el oncogén vírico se transcribe bajo el control de las secuencias promotoras y activadoras del virus, en vez de ser controlado por las secuencias reguladoras de la transcripción del proto-oncogén. Por tanto, los oncogenes se expresan en niveles mucho mayores que los proto-oncogenes y a veces se transcriben en tipos celulares que no son los adecuados. En algunos casos, esas alteraciones de la expresión génica son suficientes para convertir un proto-oncogén que funciona normalmente en un oncogén que provoca la transformación celular.

Además de estas alteraciones en la expresión génica, los oncogenes suelen codificar proteínas que difieren en estructura y función de aquéllas codificadas por sus homólogos normales. Muchos oncogenes, como *raf*, se expresan como proteínas de fusión con secuencias virales en su extremo amino terminal (Fig. 18.19). Los procesos de recombinación que dan lugar a estas proteínas de fusión suelen ocurrir durante la captura de los proto-oncogenes por los retrovirus, y normalmente, durante el proceso, se delecionan secuencias de los extremos amino y carboxilo terminal de los proto-oncogenes. Estas deleciones pueden causar que se pierdan los dominios reguladores que controlan la actividad de las proteínas proto-oncogénicas, dando lugar a proteínas oncogénicas cuya función no está regulada. Por ejemplo, el oncogén vírico *raf* codifica una proteína de fusión en la que falta la secuencia amino terminal de la proteína normal Raf. Esta secuencia amino terminal es clave para la regulación normal de la actividad proteína quinasa de Raf, y su deleción da como resultado una actividad constitutiva no regulada de la proteína Raf codificada por el oncogén. Esta actividad no regulada de Raf provoca la proliferación celular, lo que da lugar a la transformación celular.

Muchos otros oncogenes difieren de sus correspondientes proto-oncogenes debido a mutaciones puntuales, dando lugar a la sustitución de un único aminoácido en los productos oncogénicos. En algunos casos, la consecuencia de estas sustituciones de los aminoácidos (como las deleciones ya tratadas) es que no se regule la actividad de la proteína oncogénica. Un ejemplo importante de estas mutaciones puntuales lo proporcionan los oncogenes *ras*, que se tratarán en la siguiente sección al hablar de su papel en los cánceres humanos.



Figura 18.19 Proteína oncogénica Raf. La proteína proto-oncogénica Raf está constituida por un dominio regulador amino terminal y por un dominio carboxilo terminal con actividad proteína quinasa. La proteína oncogénica viral Raf carece del dominio regulador, y éste es sustituido por una secuencia de la proteína vírica Gag (Δ Gag). El resultado es que el dominio quinasa de Raf está constitutivamente activo, lo que causa la transformación celular.

Los oncogenes en el cáncer humano

Tras comprender el origen de los oncogenes retrovíricos, la siguiente cuestión era saber si los tumores que no eran inducidos por los virus contenían oncogenes celulares que se hubieran generado a partir de proto-oncogenes por mutaciones o por reordenamientos del ADN durante el desarrollo del tumor. La primera evidencia acerca del papel de los oncogenes celulares en los tumores humanos se obtuvo mediante experimentos de transferencia génica en los laboratorios de Robert Weinberg y del autor (Geoffrey Cooper) en 1981. Se encontró que el ADN de un carcinoma de vejiga humano inducía la transformación de las células en cultivo receptoras, lo que indicaba que el tumor humano contenía un oncogén celular biológicamente activo (Fig. 18.20). Desde entonces, mediante ensayos de transferencia génica y

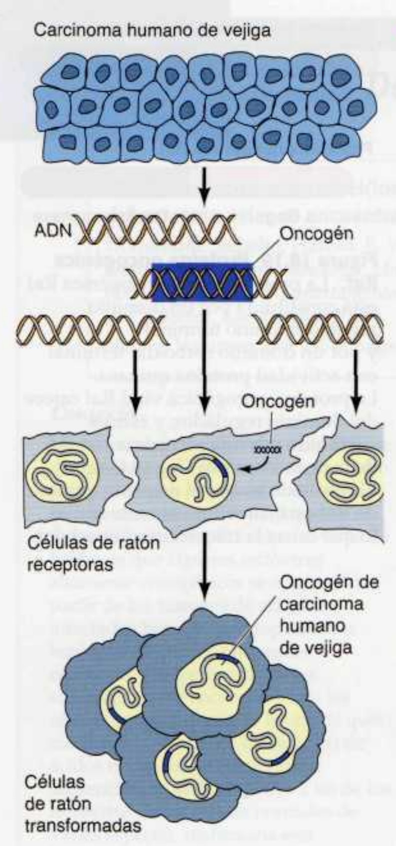


Figura 18.20 Detección de un oncogén de un tumor humano mediante transferencia génica. El ADN extraído de un carcinoma humano de vejiga indujo la transformación de células de ratón receptoras en cultivo. La transformación se debió a la integración y a la expresión de un oncogén procedente del tumor humano.

mediante otras técnicas experimentales alternativas, se han detectado oncogenes celulares activos en diferentes tipos de tumores humanos (Tabla 18.4).

Algunos de los oncogenes que se han identificado en tumores humanos son homólogos celulares de los oncogenes que previamente se caracterizaron en retrovirus, mientras que otros son oncogenes nuevos que se han descubierto por primera vez en los cánceres humanos. El primer oncogén humano identificado en los ensayos de transferencia génica fue posteriormente identificado como el homólogo humano del oncogén *ras*H del virus del sarcoma de Harvey (véase Tabla 18.3). Tres miembros relacionados de la familia de los genes *ras* (*ras*H, *ras*K y *ras*N) son los oncogenes que se encuentran con mayor frecuencia en los tumores humanos. Estos genes están implicados en aproximadamente el 25% de todos los cánceres humanos, incluyendo cerca del 50% de los cánceres de colon y el 25% de los carcinomas de pulmón.

Los oncogenes *ras* no se encuentran en las células normales; se generan en las células tumorales como consecuencia de mutaciones que ocurren durante el desarrollo del tumor. Los oncogenes *ras* difieren de sus proto-oncogenes en mutaciones puntuales cuya consecuencia es la sustitución de un único aminoácido en posiciones clave. La primera de estas mutaciones que se descubrió fue la sustitución de valina en lugar de glicina en la posición 12 (Fig. 18.21). También se encuentran frecuentemente en los oncogenes *ras* de tumores humanos otras sustituciones de aminoácidos en la posición 12, así como en las posiciones 13 y 61. En los modelos animales se ha encontrado que las mutaciones que convierten los proto-oncogenes *ras* a oncogenes son causadas por carcinógenos químicos, lo que proporciona un vínculo directo entre la acción mutagénica de los carcinógenos y la transformación celular.

Como ya se trató en el Capítulo 15, los genes *ras* codifican proteínas de unión a guanina que intervienen en la transducción de las señales mitogénicas a partir de diversos receptores de factores de crecimiento. La actividad de las proteínas Ras está controlada por la unión de GTP o GDP, de tal manera que alternan entre el estado activo (unidas a GTP) e inactivo (unidas a GDP) (véase Fig. 15.35). Las mutaciones características de los oncogenes *ras* tienen el efecto de mantener las proteínas Ras en la conformación activa unidas a GTP. En gran medida, esto se debe a que se anula la respuesta de las proteínas oncogénicas Ras a GAP (proteína activadora de la GTPasa), que activa la hidrólisis del GTP unido a Ras. Debido a que disminuye su actividad GTPasa intracelular, las proteínas oncogénicas Ras permanecen en su estado activo unidas a GTP y provocan la proliferación celular incontrolada.

Las mutaciones puntuales son solamente una de las maneras en las que los proto-oncogenes se convierten en oncogenes en los tumores humanos. Muchas células cancerosas muestran alteraciones en la estructura cromosómica, incluyendo translocaciones, duplicaciones y deleciones. Los reorde-

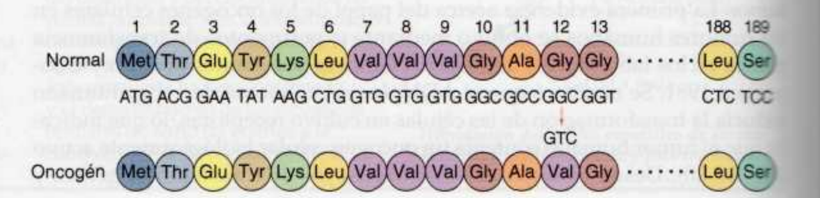


Figura 18.21 Mutaciones puntuales en los oncogenes *ras*. Un único cambio de nucleótidos, que hace que el codón 12 cambie de GGC (Gly) a GTC (Val), es la causa de la actividad transformante del oncogén *ras*H detectado en el ADN del carcinoma de vejiga.

Tabla 18.4 Oncogenes representativos de tumores humanos

Oncogén	Tipo de cáncer	Mecanismo de activación
abl	Leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda	Translocación
akt	Carcinomas de mama, ovario y páncreas	Amplificación
bcl-2	Linfoma folicular de células B	Translocación
CCND1	Adenoma paratifoideo, linfoma de células B	Translocación
CCND1	Carcinomas de células escamosas, vejiga, mama, esofágico, hepático y pulmonar	Amplificación
cdk4	Melanomas	Mutación puntual
CTNNB1	Carcinoma de colon	Mutación puntual
*erb*B	Gliomas, muchos carcinomas	Amplificación
*erb*B	Carcinomas de pulmón	Mutación puntual
*erb*B-2	Carcinomas de mama y de ovario	Amplificación
gli	Glioblastoma	Amplificación
kit	Tumores estromales gastrointestinales	Mutación puntual
c-*myc*	Linfoma de Burkitt	Translocación
c-*myc*	Carcinomas de mama y pulmón	Amplificación
L-*myc*	Carcinoma pulmonar	Amplificación
N-*myc*	Neuroblastoma, carcinoma pulmonar	Amplificación
PDGFR	Leucemia mielomonocítica crónica	Translocación
PDGFR	Tumores estromales gastrointestinales	Mutación puntual
PI3K	Carcinoma de mama	Mutación puntual
	Ovario, gástrico y pulmonar	Amplificación
PML/RARα	Leucemia promielocítica aguda	Translocación
B-*raf*	Melanoma, carcinoma de colon	Mutación puntual
*ras*H	Carcinoma tiroideo	Mutación puntual
*ras*K	Carcinomas de colon, pulmón, pancreático y tiroideo	Mutación puntual
*ras*N	Leucemias mieloide aguda y linfocítica, carcinoma tiroideo	Mutación puntual
ret	Neoplasia endocrina múltiple tipos 2A y 2B	Mutación puntual
ret	Carcinoma tiroideo	Reorganización del ADN
SMO	Carcinoma de células basales	Mutación puntual

namientos génicos que resultan de la translocación cromosómica suelen tener como consecuencia la generación de oncogenes. En algunos casos, tras el análisis de estos reordenamientos se ha encontrado que en el desarrollo del tumor están implicados oncogenes ya conocidos. En otros casos, tras el análisis de las secuencias de ADN reordenadas y tras su clonaje molecular, se han encontrado oncogenes nuevos.

El primer caso caracterizado de la activación de un oncogén por translocación cromosómica fue el del oncogén ***c-myc*** en el linfoma de Burkitt humano y en plasmocitomas de ratón, que son cánceres de los linfocitos B productores de anticuerpos (Fig. 18.22). Ambos tumores se caracterizan por translocaciones cromosómicas en las que se ven implicados genes que codifican inmunoglobulinas. Por ejemplo, en casi todos los linfomas de Burkitt se ha producido la translocación de un fragmento del cromosoma 8 a uno de los *loci* de las inmunoglobulinas, que se localizan en los cromosomas 2 (cadena ligera κ), 14 (cadena pesada) y 22 (cadena ligera λ). El hecho de que los genes de las inmunoglobulinas se expresen activamente en estos tumores sugiere que las translocaciones activan un proto-oncogén se localizaba en el punto del cromosoma 8 mediante su inserción en los *loci* de las inmunoglobulinas. Esto se investigó mediante el análisis de los ADNs de tumo-

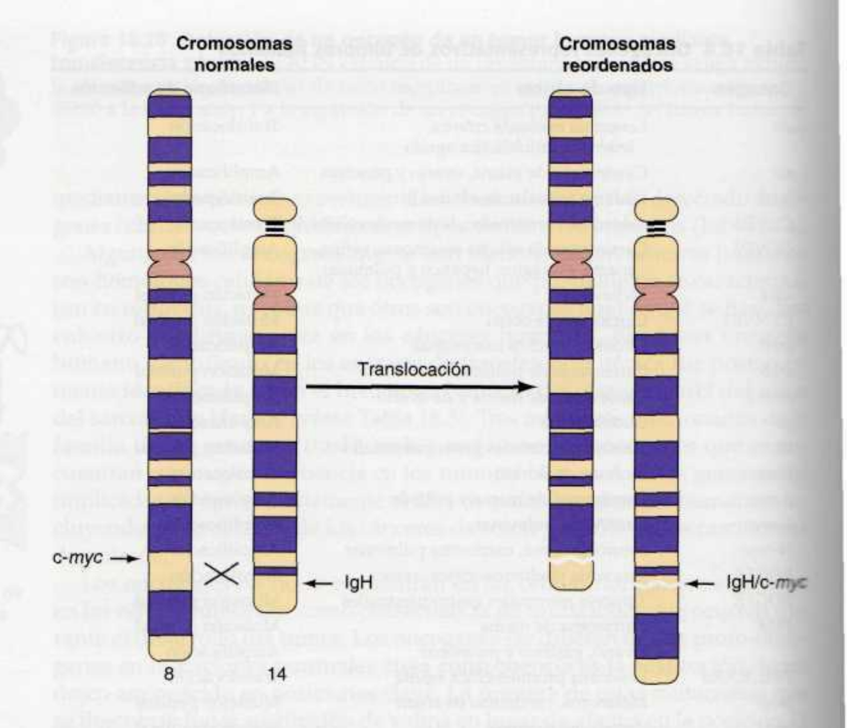


Figura 18.22 Translocación de c-*myc*. En el linfoma de Burkitt, el proto-oncogén c-*myc* se transloca desde el cromosoma 8 al *locus* de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) en el cromosoma 14; esto origina una expresión anormal de c-*myc*.

res con sondas para oncogenes conocidos, y se descubrió que el proto-oncogén c-*myc* se localizaba en el punto de ruptura de la translocación del cromosoma 8 en el linfoma de Burkitt. Estas translocaciones insertaban a c-*myc* en un *locus* de la inmunoglobulina, donde se expresaba de una manera incontrolada. El gen c-*myc* codifica un factor de transcripción que se induce como respuesta a la estimulación por un factor de crecimiento, por lo que su expresión incontrolada basta para provocar la proliferación celular y contribuir al desarrollo del tumor.

Las translocaciones de otros proto-oncogenes dan como resultado reordenamientos de secuencias codificantes, lo que conduce a la formación de productos génicos alterados. El caso típico de esto es la translocación del proto-oncogén ***abl*** desde el cromosoma 9 al cromosoma 22, en la leucemia mielogénica crónica (Fig. 18.23). Esta translocación provoca la fusión de *abl* con su compañero de translocación, un gen denominado *bcr*, en el cromosoma 22. La consecuencia es que se produce una proteína de fusión Bcr-Abl en la que el extremo amino terminal normal de la proteína proto-oncogénica Abl se ha sustituido por unas secuencias de aminoácidos de Bcr. La fusión de las secuencias de Bcr da como resultado una actividad incontrolada de la proteína-tirosina quinasa Abl, lo que provoca la transformación celular.

Un mecanismo diferente mediante el que los oncogenes se activan en los tumores humanos es la amplificación génica, que da como resultado una expresión génica elevada. La amplificación de ADN (véase Fig. 6.49) es frecuente en las células tumorales, con una frecuencia mil veces mayor que en las células normales, y la amplificación de los oncogenes puede desempeñar un papel en la progresión de muchos tumores hacia un crecimiento más rápido y un mayor carácter maligno. Por ejemplo, c-*myc* y otros dos miembros de la familia *myc* (N-*myc* y L-*myc*) aparecen amplificados de manera frecuente en diversos tumores humanos, como los carcinomas de mama y pulmón. De igual modo, en los neuroblastomas se detectan copias de N-*myc*, cuya amplificación se vincula con tumores agresivos de desarrollo rápido.

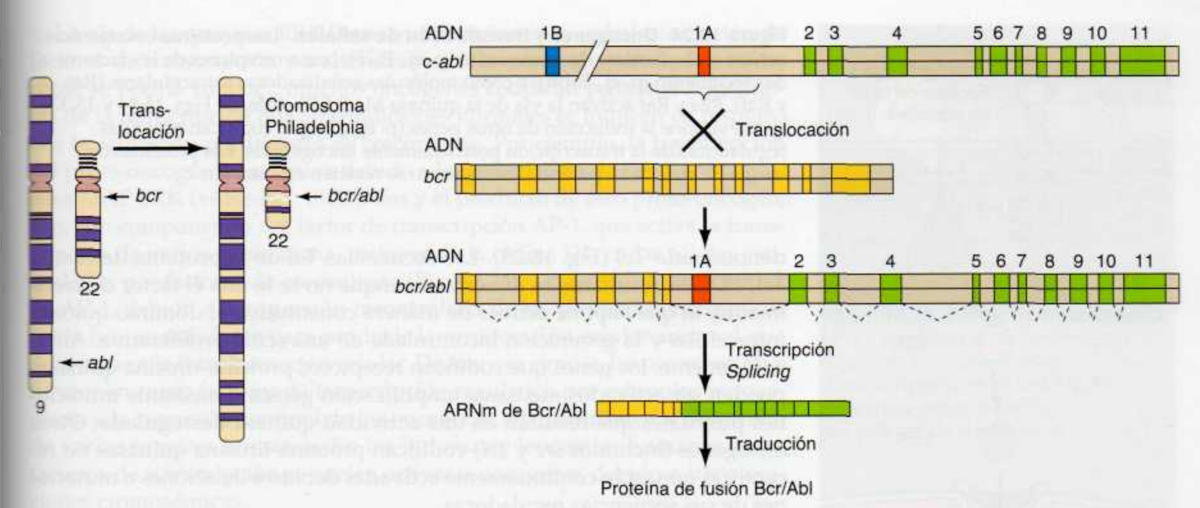


Figura 18.23 Translocación de *abl*. El oncogén *abl* se transloca desde el cromosoma 9 al cromosoma 22 formando el cromosoma Philadelphia en las leucemias mielogénicas crónicas. El proto-oncogén *abl*, que tiene dos exones iniciales alternativos (1A y 1B), se integra en la mitad del gen *bcr* del cromosoma 22. El exón 1B se deleciona a consecuencia de la translocación. La transcripción del gen fusionado se inicia en el promotor de *bcr* y sigue a lo largo de *abl*. El *splicing* da lugar a un ARNm Bcr/Abl, en el que se ha delecionado el exón 1A de *abl* y las secuencias de *bcr* se han unido al exón 2 de *abl*. El ARNm Bcr/Abl se traduce para dar lugar a una proteína recombinante Bcr/Abl de fusión.

La amplificación de otro oncogén, *erb*B-2, que codifica un receptor proteína-tirosina quinasa presenta una relación similar con el crecimiento rápido de carcinomas de mama y ovario.

Funciones de los productos oncogénicos

Los oncogenes virales y los celulares definen un gran grupo de genes (alrededor de 100 en total) que contribuyen al comportamiento anormal de las células cancerosas. Como ya se ha dicho, muchas de las proteínas codificadas por los proto-oncogenes regulan la proliferación celular normal; en estos casos, la mayor expresión o la mayor actividad de la proteína oncogénica correspondiente produce la proliferación incontrolada de las células cancerosas. Otros productos oncogénicos contribuyen a otros aspectos del comportamiento de las células cancerosas, como la incapacidad de sufrir la muerte celular programada o la diferenciación defectuosa.

La función de las proteínas oncogénicas en la regulación de la proliferación celular está ilustrada por sus actividades en las vías de transducción de la señal estimuladas por factores de crecimiento, como la activación de la señalización de ERK corriente abajo de los receptores de proteínas-tirosina quinasas (Fig. 18.24). Las proteínas oncogénicas pertenecientes a esta vía incluyen factores de crecimiento polipeptídicos, receptores de factores de crecimiento, proteínas de señalización intracelular, factores de transcripción y el regulador del ciclo celular ciclina D1.

La acción de los factores de crecimiento como proteínas oncogénicas se debe a su expresión anormal, lo que conduce a una situación en la que la célula tumoral produce un factor de crecimiento al cual también responde. El resultado es una estimulación autocrina de la célula productora del factor de crecimiento (véase Fig. 18.8), lo que causa la proliferación anormal de la célula y contribuye al desarrollo de una gran variedad de tumores humanos.

Un gran grupo de oncogenes codifica receptores de factores de crecimiento, la mayoría de los cuales son proteína-tirosina quinasas. Estos receptores se suelen convertir en proteínas oncogénicas al sufrir alteraciones en sus dominios amino terminales, los cuales normalmente unirían factores de crecimiento extracelulares. Por ejemplo, el receptor para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) se convierte en un oncogén en algunas leucemias humanas debido a una translocación cromosómica en la que el extremo amino terminal normal del receptor de PDGF (PDGFR) se sustituye por una secuencia amino terminal de un factor de transcripción

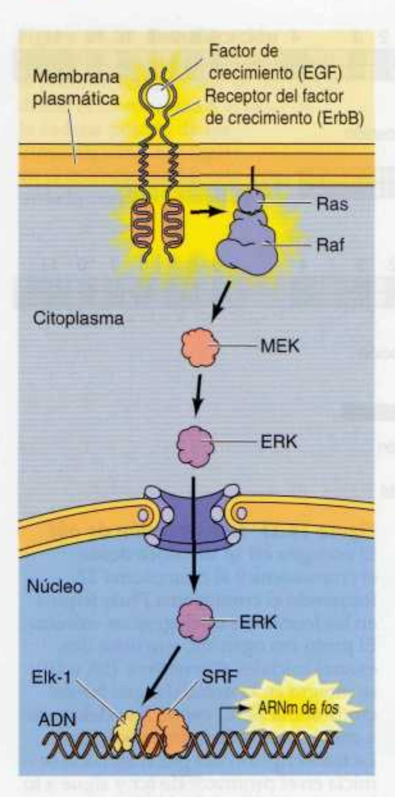
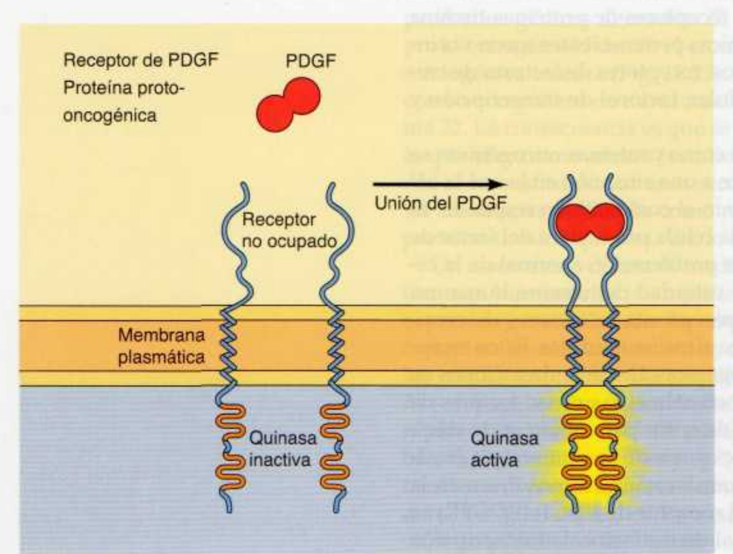


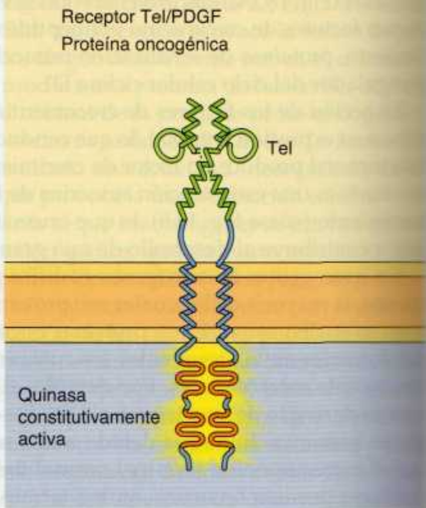
Figura 18.24 Oncogenes y transducción de señales. Las proteínas oncogénicas actúan como factores de crecimiento (p. ej., EGF), como receptores de los factores de crecimiento (p. ej., ErbB), y como moléculas señalizadoras intracelulares (Ras y Raf). Ras y Raf activan la vía de la quinasa MAP ERK (véanse Figs. 15.34 y 15.37), lo que supone la inducción de otros genes (p. ej., *fos*) que codifican proteínas reguladoras de la transcripción potencialmente oncogénicas. Las proteínas de las que se conoce su potencial oncogénico se resaltan en amarillo.

denominado Tel (Fig. 18.25). Las secuencias Tel de la proteína de fusión Tel/PDGFR resultante se dimerizan aunque no se le una el factor de crecimiento, lo que supone activar de manera constitutiva al dominio quinasa intracelular y la generación incontrolada de una señal proliferativa. Alternativamente, los genes que codifican receptores proteína-tirosina quinasas pueden ser activados mediante amplificación génica o mediante mutaciones puntuales que resultan en una actividad quinasa desregulada. Otros oncogenes (incluidos *src* y *abl*) codifican proteína-tirosina quinasas no receptoras que están continuamente activadas debido a deleciones o mutaciones de sus secuencias reguladoras.

Las proteínas Ras desempeñan un papel fundamental en la señalización de la mitosis, acoplando los receptores de los factores de crecimiento a la activación de la proteína-serina/treonina quinasa Raf, lo que inicia una cascada de proteína quinasa que conduce a la activación de la quinasa MAP ERK (véase Fig. 15.34). Como ya se trató anteriormente, las mutaciones que convierten a los proto-oncogenes *ras* en oncogenes provocan una activación continua de Ras, lo que lleva a la activación de la vía ERK. Igualmente, los miembros de la familia génica *raf* pueden adquirir capacidad oncogénica a través de mutaciones que desregulan la actividad Raf quinasa, lo que da lugar a la activación constitutiva de ERK.

Figura 18.25 Mecanismo de la activación del oncogén Tel/PDGFR. El receptor de PDGF normal (PDGFR) se activa por una dimerización inducida por la unión del PDGF. El oncogén Tel/PDGFR codifica una proteína de fusión en la que el dominio extracelular normal del receptor de PDGF es sustituido por la secuencia amino terminal del factor de transcripción Tel, que incluye su dominio de dimerización hélice-bucle-hélice (véase Fig. 7.28). Esta secuencia se dimeriza en ausencia de PDGF, lo que supone la activación constitutiva de la proteína quinasa oncogénica.





La vía de las quinasas ERK lleva, en última instancia, a la fosforilación de factores de transcripción y a alteraciones en la expresión génica. Por tanto, como se podría suponer, muchos oncogenes codifican proteínas reguladoras de la transcripción que en condiciones normales se inducen en respuesta a la activación por factores de crecimiento. Por ejemplo, la transcripción del proto-oncogén *fos* se activa debido a la fosforilación de Elk-1 por la quinasa MAP ERK (véase Fig. 18.24). **Fos** y el producto de otro proto-oncogén, **Jun**, son componentes del factor de transcripción AP-1, que activa la transcripción de varios genes diana, incluyendo la ciclina D1, en las células estimuladas por factores de crecimiento (Fig. 18.26). La actividad constitutiva de AP-1, debida a la expresión incontrolada de las proteínas oncogénicas Fos o Jun, es suficiente para producir la proliferación celular anormal que dará lugar a la transformación celular. De manera similar, las proteínas Myc funcionan como factores de transcripción regulados por estímulos mitogénicos, y la expresión anormal de los oncogenes *myc* contribuye al desarrollo de varios tumores humanos. En los linfomas y leucemias humanas, otros factores de transcripción se suelen activar a oncogenes debido a translocaciones cromosómicas.

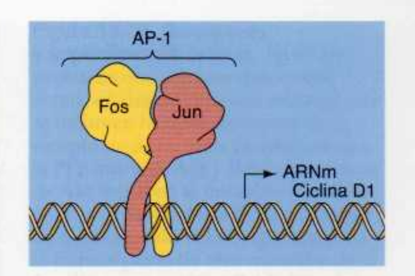


Figura 18.26 Factor de transcripción AP-1. Fos y Jun se dimerizan para constituir AP-1 que activa la transcripción de ciclina D1 y diversos genes inducibles por factores de crecimiento.

Las vías de señalización intracelular que se activan mediante una estimulación por factores de crecimiento regulan, en última instancia, los componentes de la maquinaria del ciclo celular que inducen la progresión a través del punto de restricción en G_1. Las ciclinas de tipo D se activan en respuesta a la estimulación por los factores de crecimiento (al menos en parte a través de la activación del factor de transcripción AP-1) y desempeñan un papel fundamental como vínculos entre la señalización a través de dichos factores de crecimiento y la progresión del ciclo celular. No debe sorprender que el gen que codifica la ciclina D1 sea un proto-oncogén, que se puede activar para dar lugar a un oncogén (denominado ***CCND1***) mediante una translocación cromosómica o amplificación génica. Estas alteraciones conducen a la expresión constitutiva de la ciclina D1, lo que induce la proliferación celular en ausencia de la estimulación por los factores de crecimiento. El socio catalítico de la ciclina D1, Cdk4, también es activado como oncogén por mutaciones puntuales en los melanomas.

Los componentes de otras vías de señalización descritas en el Capítulo 15, incluyendo las vías de señalización acopladas a proteínas G, la vía NF-κB, y las vías Hedgehog, Wnt y Notch, también pueden actuar como oncogenes. Por ejemplo, las proteínas Wnt fueron identificadas como oncogenes en el cáncer de mama de ratón, y mutaciones activadoras frecuentemente convierten a la diana corriente abajo de Wnt, la β-catenina, en un oncogén (*CTNNB1*) en el cáncer de colon humano (Fig. 18.27). Estas mutaciones activadoras estabilizan a la β-catenina, que entonces forma un complejo con Tcf y estimula la transcripción de los genes diana. Las dianas de la β-catenina/Tcf incluyen los genes que codifican para c-Myc y la ciclina D1, dando lugar a la proliferación celular desregulada. Debe tenerse en cuenta que la señalización por Wnt normalmente estimula la proliferación de las células madre y su progenie durante la continua renovación celular en el colon (véase Fig. 17.19), indicando que el cáncer de colon resulta de una actividad anormal de la misma vía que señaliza la proliferación fisiológicamente normal de las células epiteliales.

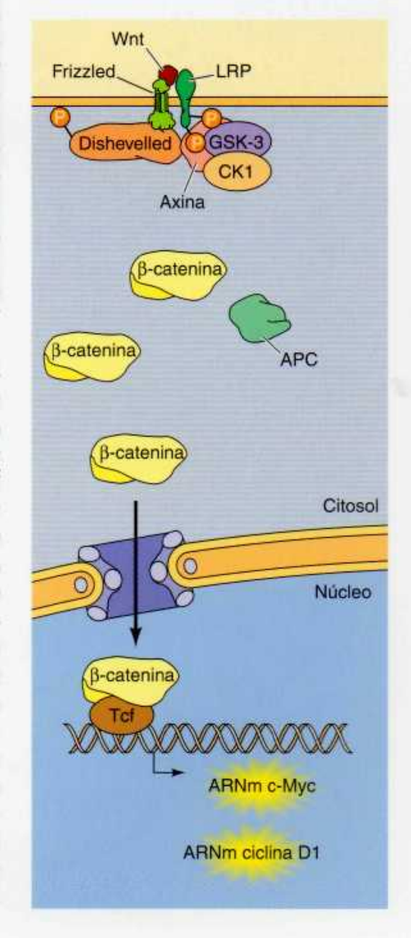


Figura 18.27 Actividad oncogénica de la vía Wnt. Los polipéptidos Wnt se unen a los receptores Frizzled y LRP, lo que da lugar a la fosforilación de Dishevelled y LRP. De este modo se crean sitios de unión de axina y se induce la disociación del complejo axina/APC/CK1/GSK-3 y la estabilización de la β-catenina. Esta molécula se transloca al núcleo para complejarse con los factores de transcripción Tcf y activar los genes diana, como los que codifican c-Myc y la ciclina D1. Los genes que codifican Wnt y β-catenina pueden tener actividad oncogénica.

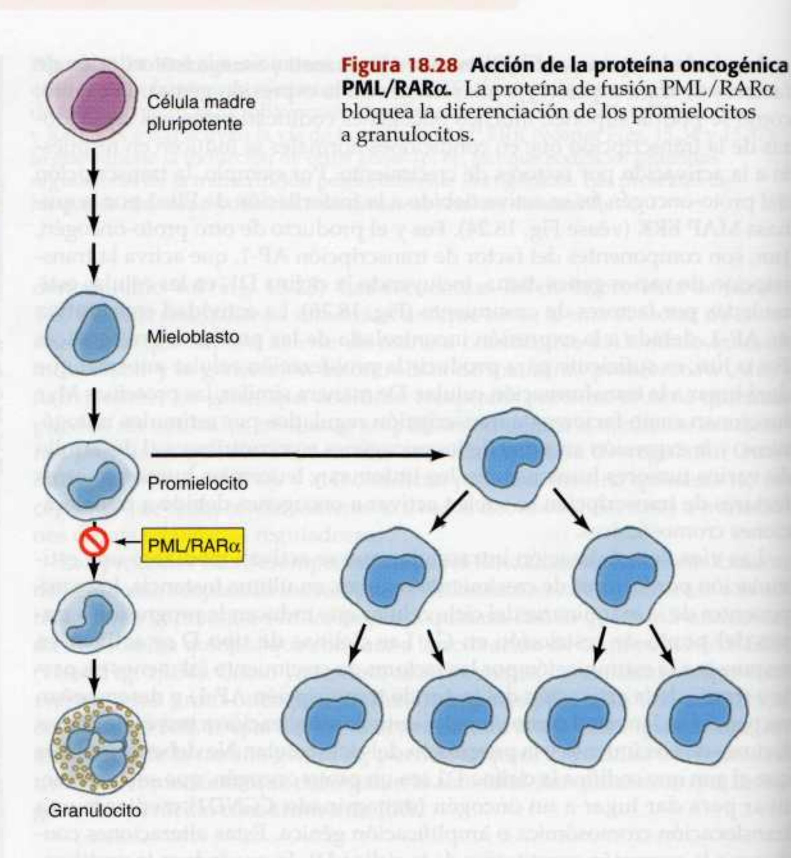


Figura 18.28 Acción de la proteína oncogénica PML/RARα. La proteína de fusión PML/RARα bloquea la diferenciación de los promielocitos a granulocitos.

Aunque la mayoría de los oncogenes estimulan la proliferación celular, sin embargo la actividad oncogénica de algunos factores de transcripción se debe a que inhiben la diferenciación celular. Como ya se mencionó en el Capítulo 15, la hormona tiroidea y el ácido retinoico inducen la diferenciación de varios tipos celulares. Estas hormonas atraviesan la membrana plasmática y se unen a los receptores intracelulares que actúan como moléculas reguladoras de la transcripción. Las formas mutadas del receptor de la hormona tiroidea (**ErbA**) y del receptor del ácido retinoico (**PML/RARα**) intervienen como proteínas oncogénicas en la eritroleucemia de los pollos y en la leucemia promielocítica aguda humana, respectivamente. En ambos casos, parece ser que los receptores oncogénicos mutados interfieren con la acción de sus homólogos normales, bloqueando la diferenciación celular y manteniendo las células leucémicas proliferando de manera activa (Fig. 18.28). En el caso de la leucemia promielocítica aguda, unas altas dosis de ácido retinoico pueden vencer el efecto de la proteína oncogénica PML/RARα e inducir la diferenciación de las células leucémicas. Esta observación biológica tiene una implicación clínica: se puede tratar de manera efectiva a los pacientes con leucemia promielocítica aguda administrándoles ácido retinoico, que induce la diferenciación y bloquea la proliferación celular.

Como ya se trató anteriormente en este capítulo, la incapacidad de las células cancerosas de sufrir la muerte celular programada, o apoptosis, es un factor crítico en el desarrollo de tumores, y varios oncogenes codifican proteínas que intervienen promoviendo la supervivencia celular (Fig. 18.29). La supervivencia de la mayoría de las células animales depende de su estimulación por los factores de crecimiento, por lo que aquellos oncogenes que codifican factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y

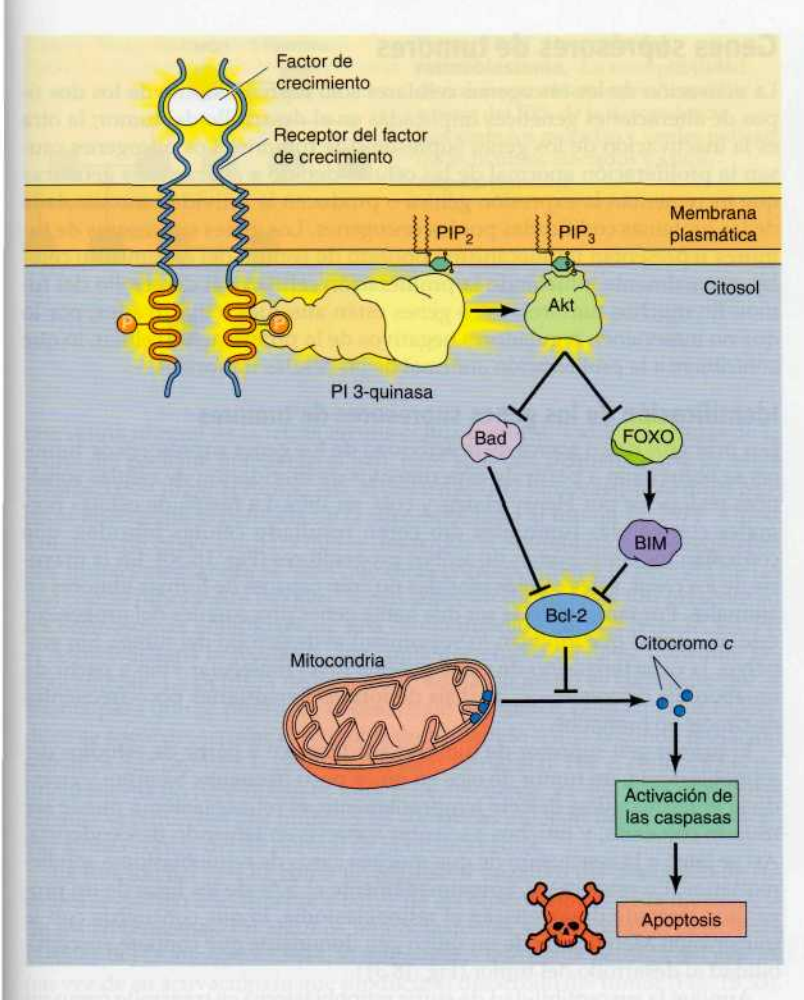


Figura 18.29 Oncogenes y supervivencia celular. Entre las proteínas oncogénicas que actúan como señales de supervivencia celular se incluyen factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, la PI 3 quinasa, Akt y Bcl-2. Las dianas de Akt incluyen al miembro Bad de la familia proapoptótica Bcl-2 y al factor de transcripción FOXO, que estimula la transcripción de otro miembro de la familia proapoptótica Bcl-2, Bim. La fosforilación por Akt inhibe tanto a Bad como a FOXO, estimulando la supervivencia celular. La proteína Bcl-2 también funciona como un oncogén estimulando la supervivencia celular e inhibiendo la liberación de citocromo *c* desde las mitocondrias. Las proteínas con potencial oncogénico están *marcadas con un brillo amarillo.*

proteínas señalizadoras como Ras, intervienen no sólo estimulando la proliferación celular sino también evitando la muerte celular. Como ya se trató en el Capítulo 17, la vía de señalización de la PI 3-quinasa/Akt desempeña un papel fundamental en la prevención de la apoptosis de muchas células dependientes de los factores de crecimiento, y los genes que codifican la **PI 3-quinasa** y **Akt** actúan como oncogenes en los retrovirus y en algunos tumores humanos. Entre las dianas de la PI 3-quinasa/Akt se incluye un miembro de la familia Bcl-2, Bad, que es inactivado como resultado de la fosforilación por Akt, además del factor de transcripción FOXO, que regula la expresión del miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, Bim. Adicionalmente, resulta notable que el propio **Bcl-2** fue descubierto en primer lugar como el producto de un oncogén en linfomas humanos. El oncogén *bcl*-2 se genera mediante una translocación cromosómica cuya consecuencia es una expresión elevada de Bcl-2, lo que bloquea la apoptosis y mantiene la supervivencia celular bajo condiciones que normalmente inducirían la muerte de la célula. La identificación de *bcl*-2 como un oncogén no sólo proporcionó la primera demostración acerca de la importancia de la muerte celular programada en el desarrollo del cáncer, sino que llevó al descubrimiento del papel que tienen Bcl-2 y otros genes relacionados como reguladores principales de la apoptosis en organismos que van desde *C. elegans* hasta el ser humano.

Genes supresores de tumores

La activación de los oncogenes celulares sólo representa uno de los dos tipos de alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo del tumor; la otra es la inactivación de los genes supresores de tumores. Los oncogenes causan la proliferación anormal de las células debido a alteraciones genéticas que incrementan la expresión génica o producen la actividad incontrolada de las proteínas codificadas por los oncogenes. Los **genes supresores de tumores** representan un mecanismo opuesto de control del crecimiento celular, normalmente inhibiendo la proliferación celular y el desarrollo del tumor. En muchos tumores, estos genes están ausentes o inactivados, por lo que no intervienen reguladores negativos de la proliferación celular, lo que contribuye a la proliferación anormal de las células tumorales.

Identificación de los genes supresores de tumores

Los primeros datos acerca de la actividad de los genes supresores de tumores se obtuvieron a partir de experimentos de hibridación de células somáticas realizados por Henry Harris y cols. en 1969. La fusión de células normales con células tumorales dio como resultado células híbridas, que contenían los cromosomas de ambos progenitores (Fig. 18.30). En la mayoría de los casos, estas células híbridas no eran capaces de formar tumores en animales. Por tanto, parecía ser que había genes procedentes del progenitor celular normal que inhibían (o suprimían) el desarrollo del tumor. Sin embargo, la caracterización de estos genes a nivel molecular vino a partir de un abordaje diferente —el análisis de formas hereditarias poco frecuentes de cáncer en humanos.

El primer gen supresor de tumores se identificó a partir de estudios del retinoblastoma, un tumor de ojos en niños poco frecuente. Siempre y cuando la enfermedad se detecte tempranamente, el retinoblastoma puede ser tratado con éxito, y muchos pacientes sobreviven teniendo descendencia. Así se llegó a la conclusión de que muchos casos de retinoblastoma son hereditarios. En estos casos, aproximadamente el 50% de los hijos de un progenitor afectado desarrollarán el retinoblastoma, lo que concuerda con la transmisión Mendeliana de un único gen dominante que confiere susceptibilidad al desarrollo del tumor (Fig. 18.31).

Aunque la susceptibilidad de sufrir retinoblastoma se transmite como un carácter dominante, la herencia de este gen no es suficiente para transformar

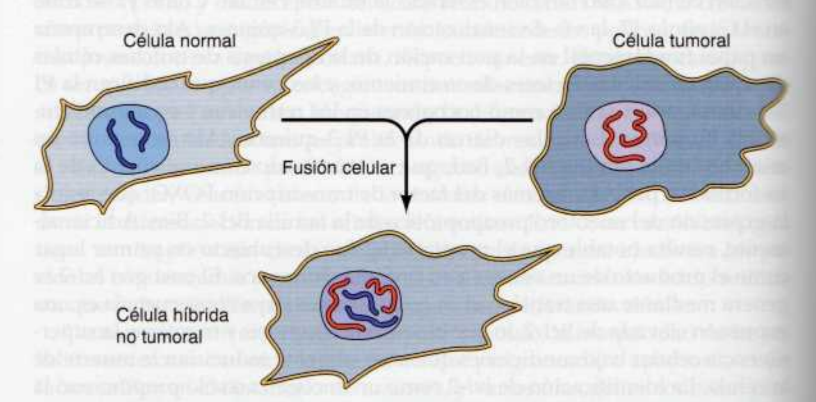


Figura 18.30 Supresión de la capacidad de génesis tumoral mediante fusión celular. La fusión de células tumorales con células sanas dio lugar a híbridos que contenían cromosomas de ambos progenitores. Estos híbridos no suelen tener capacidad de generar tumores.

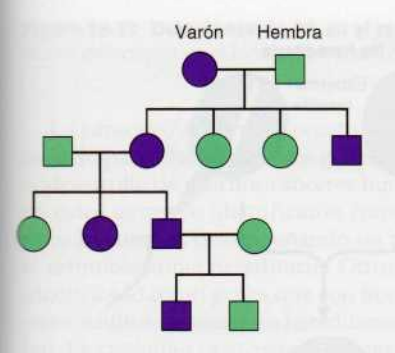


Figura 18.31 Herencia del retinoblastoma. La susceptibilidad de sufrir retinoblastoma se transmite a cerca del 50% de la descendencia. Los símbolos morados y verdes indican los individuos afectados y sanos, respectivamente.

una célula normal de la retina en una célula tumoral. Todas las células de la retina del paciente heredarán el gen, pero sólo una pequeña parte de estas células darán lugar al tumor. Así, el desarrollo del tumor requiere otros procesos además de la herencia de la susceptibilidad al tumor. En 1971, Alfred Knudson propuso que para que se desarrolle el retinoblastoma se requieren dos mutaciones; ahora se sabe que éstas corresponden a la pérdida de las dos copias funcionales del gen (el gen supresor de tumores ***Rb***) presente en los cromosomas homólogos de una célula diploide normal (Fig. 18.32). En el retinoblastoma hereditario, una copia defectuosa de *Rb* se transmite genéticamente. La pérdida de esta única copia de *Rb* no es suficiente por sí misma para que se produzca el desarrollo del tumor, pero en estos individuos se suele desarrollar el retinoblastoma debido a una segunda mutación somática que produce la pérdida del alelo *Rb* normal. Por el contrario, el retinoblastoma no hereditario es muy poco frecuente, ya que para que se desarrolle se requieren dos mutaciones somáticas independientes para inactivar ambas copias del *Rb* normal de la misma célula.

La función del gen *Rb* como un regulador negativo del desarrollo de tumores se dedujo inicialmente a partir de las observaciones de la morfología de los cromosomas. En algunos retinoblastomas se encontraron deleciones visibles del cromosoma 13q14, lo que sugería que era la pérdida del gen *Rb* (en vez de su activación) lo que producía el desarrollo del tumor (Fig. 18.33). Posteriormente, estudios de mapeo genético indicaron que el desarrollo del tumor se debía a la pérdida de los alelos *Rb* normales en las células tumorales, lo que estaba de acuerdo con la función de *Rb* como un gen supresor de tumores. El clonaje de *Rb* en 1986 estableció de manera definitiva que en los retinoblastomas *Rb* se ha perdido o ha mutado. Los experimentos de transferencia génica también demostraron que si se introducía un gen *Rb* normal en células de retinoblastoma revertía su capacidad tumoral, lo que era una evidencia directa de la actividad de *Rb* como supresor de tumores.

Aunque *Rb* se identificó en un cáncer infantil poco común, también interviene en algunos de los tumores más comunes de los adultos. Concretamente, a partir de los estudios del gen clonado se ha establecido que *Rb* falta o es inactivo en muchos carcinomas de vejiga, mama y pulmón. Por tanto, la importancia del gen supresor de tumores *Rb* trasciende al retinoblastoma, y mutaciones del gen *Rb* contribuyen al desarrollo de una parte importante de los cánceres humanos más comunes. Además, como se mencionó anteriormente en este capítulo, la proteína Rb es una diana importante de las proteínas oncogénicas de varios virus tumorales de ADN, incluyendo al SV40, al adenovirus y al papilomavirus humano, que se unen a Rb e inhiben su actividad (Fig. 18.34). Por tanto, la transformación por estos virus se debe, al menos en parte, a la inactivación de Rb a nivel de proteínas, en vez de a una mutación que cause la inactivación del gen *Rb*.

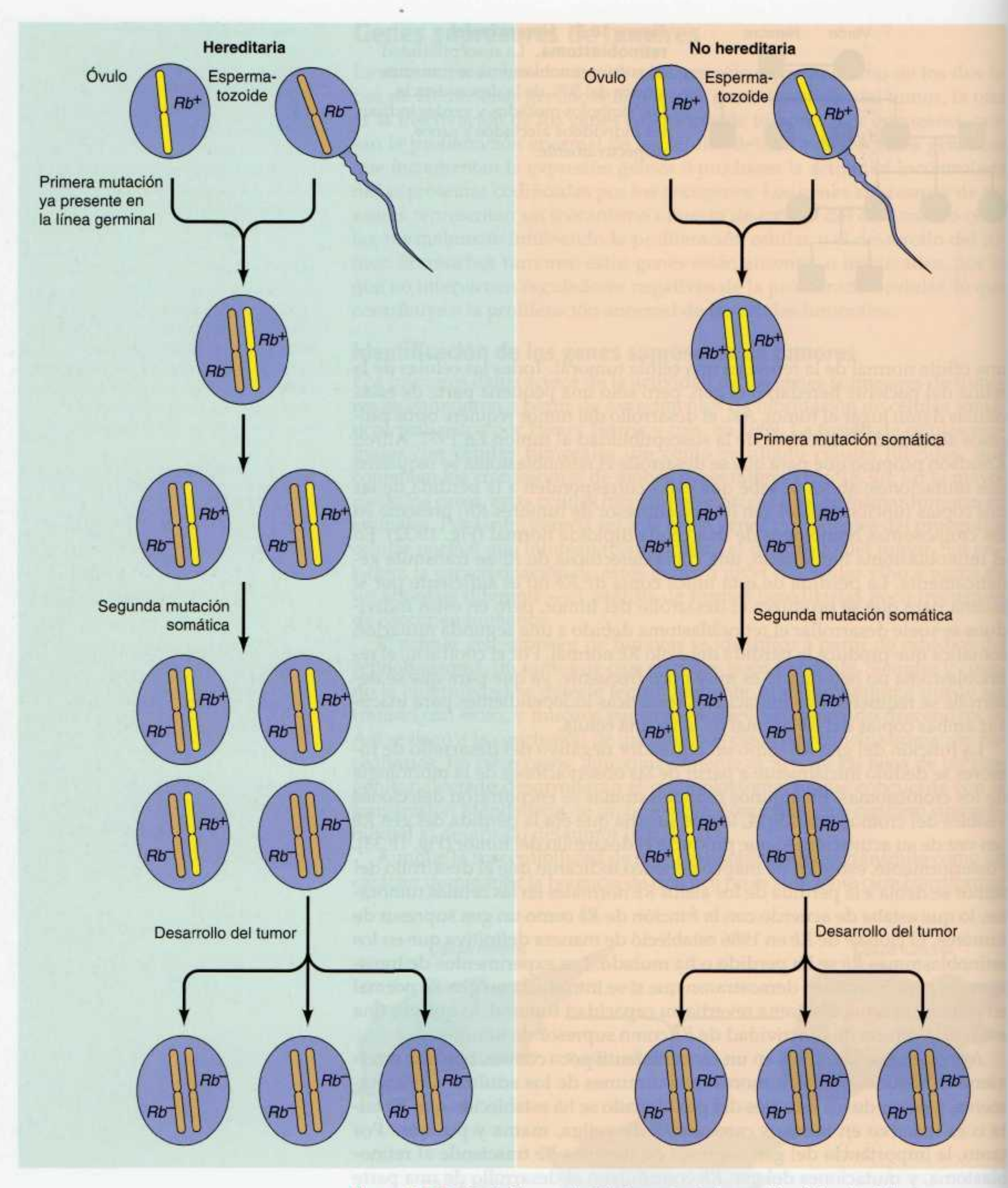


Figura 18.32 Mutaciones de *Rb* durante el desarrollo del retinoblastoma. En el retinoblastoma hereditario se hereda del progenitor afectado una copia defectuosa del gen *Rb* (Rb^-). Una segunda mutación somática, que inactiva la única copia sana Rb^+ de la célula de la retina, provoca el desarrollo del retinoblastoma. En los casos no hereditarios, se heredan dos genes Rb^+ normales, y sólo se desarrolla el retinoblastoma si dos mutaciones somáticas inactivan ambas copias de *Rb* en la misma célula.

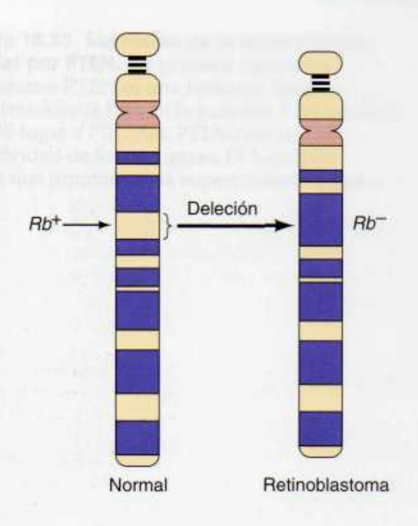


Figura 18.33 Deleciones de *Rb* en el retinoblastoma. Muchos retinoblastomas tienen deleciones en el *locus* cromosómico (13q14) donde se localiza el gen *Rb*.

La caracterización de *Rb* como un gen supresor de tumores sirvió como modelo para identificar otros genes supresores de tumores que contribuyen al desarrollo de muchos cánceres humanos diferentes (Tabla 18.5). Algunos de estos genes se identificaron como las causas de cánceres hereditarios poco frecuentes, desempeñando un papel similar al que desempeña *Rb* en el retinoblastoma hereditario. Otros genes supresores de tumores se han identificado como genes que con frecuencia faltan o están mutados en cánceres adultos comunes no hereditarios, como es el caso del carcinoma de colon. En cualquier caso, parece ser que la mayoría de los genes supresores de tumores intervienen en el desarrollo de tipos de cáncer hereditarios y no hereditarios. Así, la mutación de algunos genes supresores de tumores parece ser la alteración molecular más común responsable del desarrollo de un tumor humano.

El siguiente gen supresor de tumores identificado fue *p53*, que suele encontrarse inactivado en una gran variedad de cánceres humanos, incluyendo leucemias, linfomas, sarcomas, tumores cerebrales y carcinomas de diversos tejidos, como los de mama, colon y pulmón. En total las mutaciones de *p53* intervienen en el 50% de los cánceres, lo que hace de él la diana susceptible de alteraciones genéticas más frecuente en los cánceres humanos. También hay que destacar que las mutaciones hereditarias de *p53* son las responsables de la transmisión genética de un síndrome canceroso hereditario poco frecuente, en el que los individuos afectados desarrollan cualquier tipo de cáncer. Además, la proteína p53 (al igual que Rb) es una diana para las proteínas oncogénicas del SV40, adenovirus y papilomavirus humano.

Al igual que *p53*, los genes supresores de tumores *INK4 y PTEN* se encuentran frecuentemente mutados en cánceres comunes, incluyendo el cáncer de pulmón, de próstata y el melanoma. Otros genes supresores de tumores (incluyendo *APC*, *TβRII*, *Smad2* y *Smad4*) a menudo se encuentran inactivados en los cánceres de colon. Además de estar implicados en casos no hereditarios de cáncer común en adultos, las mutaciones hereditarias del gen *APC* son responsables de una forma infrecuente hereditaria de cáncer de colon, denominada poliposis adenomatosa familiar. Los individuos que padecen esta condición desarrollan cientos de adenomas benignos en el colon (pólipos), algunos de los cuales inevitablemente progresan hacia la ma-

■ **Inicialmente se creía que *p53* era un oncogén porque los genes mutados de *p53* encontrados en muchas células cancerosas inducía la transformación en ensayos de transferencia génica. Estudios posteriores demostraron que *p53* era en realidad un supresor de tumores y que los genes de *p53* mutantes encontrados en muchos tumores, actuaban como dominantes negativos que inducían la transformación interfiriendo con la función normal de *p53*.**

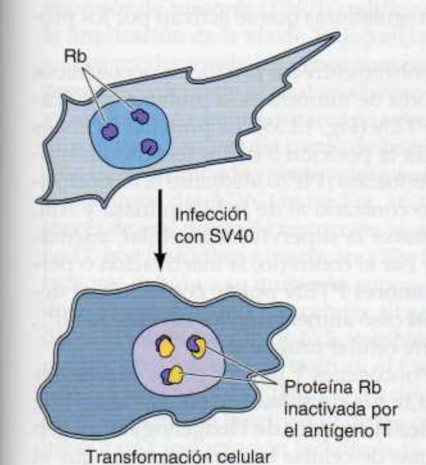


Figura 18.34 Interacción de Rb con proteínas oncogénicas de virus tumorales de ADN. Las proteínas oncogénicas de varios virus tumorales de ADN (p. ej., el antígeno T de SV40) inducen la transformación mediante la unión y la inactivación de la proteína Rb.

Tabla 18.5 Genes supresores de tumores

Gen	Tipo de cáncer
APC	Carcinoma de colon/recto
BRCA1	Carcinomas de mama y ovario
BRCA2	Carcinoma de mama
INK4	Melanoma, carcinoma de pulmón, tumores cerebrales, leucemias, linfomas
NF1	Neurofibrosarcoma
NF2	Meningioma
p53	Tumores cerebrales; carcinomas de mama, de colon/recto, de esófago, hepático y de pulmón; sarcomas; leucemias y linfomas
PTCH	Carcinoma de las células basales
PTEN	Tumores cerebrales; melanoma; carcinomas de próstata, endometrio, riñón y pulmón
Rb	Retinoblastoma; sarcomas; carcinomas de vejiga, mama y pulmón
Smad2	Carcinoma de colon/recto
Smad4	Carcinoma de colon/recto, carcinoma pancreático
Tβ RII	Carcinoma de colon/recto, carcinoma gástrico
VHL	Carcinoma de las células renales
WT1	Tumor de Wilms

lignidad. Las mutaciones heredadas de otros dos genes supresores de tumores, *BRCA1* y *BRCA2*, son responsables de los casos hereditarios de cáncer de mama, que constituyen el 5% del total de la incidencia del cáncer de mama. Algunos genes supresores de tumores adicionales se han implicado en el desarrollo de tumores cerebrales, cánceres pancreáticos y carcinomas de células basales de la piel, además de en diversos síndromes de cáncer hereditarios infrecuentes, como el tumor de Wilms.

Funciones de los productos de los genes supresores de tumores

A diferencia de las proteínas oncogénicas y proto-oncogénicas, las proteínas codificadas por la mayoría de los genes supresores de tumores inhiben la proliferación o la supervivencia de la célula. Por tanto, la inactivación de los genes supresores de tumores conduce al desarrollo del tumor eliminando proteínas de regulación negativa. En varios casos las proteínas supresoras de tumores inhiben las mismas vías reguladoras que se activan por los productos de los oncogenes.

Un ejemplo interesante del antagonismo entre los productos oncogénicos y los productos de los genes supresores de tumores es la proteína codificada por el gen supresor de tumores *PTEN* (Fig. 18.35). La proteína PTEN es una fosfatasa lipídica que desfosforila la posición 3 de los fosfatidilinosítidos, como el fosfatidilinositol 3, 4, 5-bifosfato (PIP_3). Mediante la desfosforilación de PIP_3, PTEN ejerce el efecto contrario al de la PI3-quinasa y Akt, que actúan como oncogenes al promover la supervivencia celular, además de estimular la proliferación celular. Por el contrario, la inactivación o pérdida de la proteína supresora de tumores PTEN puede contribuir al desarrollo del tumor debido a que en tal caso aumentarán los niveles de PIP_3, se activará Akt, y se inhibirá la muerte celular programada.

Las proteínas codificadas por los oncogenes y por los genes supresores de tumores también intervienen en la vía de señalización de Hedgehog (véase Fig. 15.43). *Patched* (que codifica el receptor de Hedgehog) es un gen supresor de tumores de los carcinomas de células basales, mientras que el

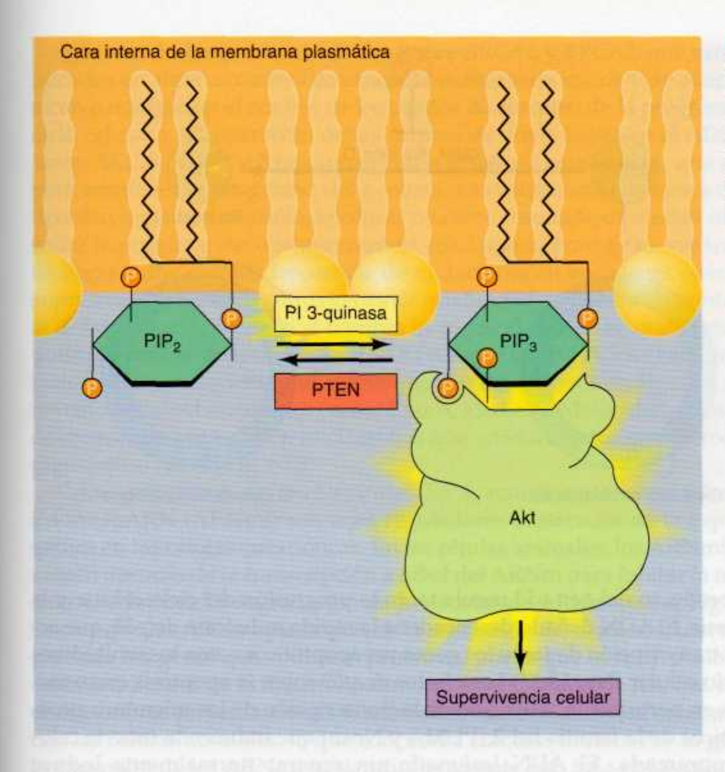


Figura 18.35 Supresión de la supervivencia celular por PTEN. La proteína supresora de tumores PTEN es una fosfatasa lipídica que desfosforila PIP_3 en la posición 3 del inositol, dando lugar a PIP_2. Así, PTEN contrarresta la actividad de los oncogenes PI 3-quinasa y Akt que promueven la supervivencia celular.

gen que codifica Smoothened (inhibido por Patched) actúa como un oncogén. Por otra parte, los factores de transcripción Gli, que resultan inactivados por Smoothened, se identificaron inicialmente como proteínas codificadas por un oncogen (*gli*) que se amplificaba en los glioblastomas.

Varios genes supresores de tumores codifican proteínas reguladoras de la transcripción. Un ejemplo serían los genes supresores de tumores *Smad2* y *Smad4*, que codifican factores de transcripción activados por señales de la vía de TGF-β e inducen la inhibición de la proliferación celular (véase Fig. 15.41). Entre los genes diana inducidos por la proteínas Smad figuran los inhibidores de Cdk, p15, p21, p27 y p57 (véase Tabla 16.1), los cuales estimulan la detención de la proliferación celular en la fase G_1 del ciclo celular. Otro gen supresor de tumores (*TβRII*) codifica el receptor de TGF-β, lo que respalda la implicación de la vía de TGF-β en la inhibición de la proliferación celular.

Los productos de los genes supresores de tumores *Rb* e *INK4* regulan la progresión del ciclo celular en el mismo lugar en el que lo hace la ciclina D1 y Cdk4, siendo ambos capaces de actuar como oncogenes (Fig. 18.36). Rb inhibe el paso a través del punto de restricción en G_1 reprimiendo la transcripción de determinados genes relacionados con la progresión del ciclo celular y la síntesis del ADN (véase Fig. 16.17). En las células normales el paso a través de este punto de restricción se regula por los complejos Cdk4, 6/ciclina D, que fosforilan e inactivan a Rb. Por tanto, la inactivación de *Rb* en los tumores debido a su mutación supone la pérdida de un regulador negativo de la progresión del ciclo celular. El gen supresor de tumores *INK4*, que codifica al inhibidor p16 de Cdk, también regula el paso a través del punto de restricción. Como ya se trató en el Capítulo 16, p16 inhibe la actividad de Cdk4, 6/ciclina D. Por tanto, la inactivación de *INK4* tiene como consecuencia el aumento de la actividad de los complejos Cdk4, 6/ciclina D, lo que da lugar a una fosforilación incontrolada de Rb.

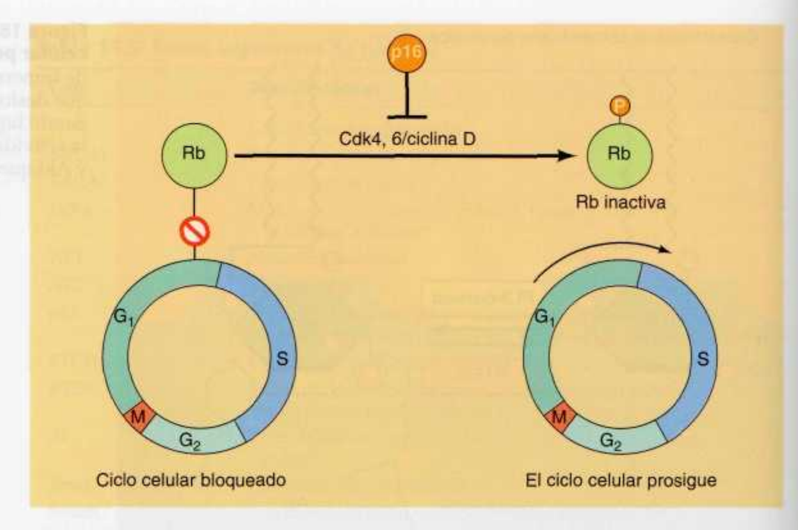


Figura 18.36 Inhibición de la progresión del ciclo celular por Rb y p16. Rb inhibe la progresión a través del punto de restricción en G_1. Los complejos Cdk4, 6/ciclina D promueven el paso a través del punto de restricción mediante la fosforilación e inactivación de Rb. La actividad de Cdk4, 6/ciclina D es inhibida por p16. Rb y p16 son supresores de tumores, mientras que la ciclina D1 y Cdk4 son oncogenes.

El producto del gen *p53* regula tanto la progresión del ciclo celular y la apoptosis. El ADN dañado desencadena la rápida inducción de p53, que activa la transcripción de tanto los genes proapoptóticos como los inhibidores del ciclo celular (Fig. 18.37) Los efectos de p53 sobre la apoptosis están mediados en parte por la activación de la transcripción de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (PUMA y Noxa) que inducen la muerte celular programada. El ADN lesionado sin reparar normalmente induce apoptosis en las células de mamífero, una respuesta que presumiblemente es ventajosa para el organismo porque elimina las células que portan mutaciones potencialmente deletéreas (p. ej., las células podrían desarrollarse para dar células cancerosas). Las células que carecen de p53 no sufren apoptosis en respuesta a agentes que dañan al ADN, incluyendo la radiación y muchos de los principios activos empleados en la quimioterapia contra el cáncer. Este fallo a sufrir apoptosis en respuesta al ADN dañado contribuye a la resistencia de muchos tumores a la quimioterapia. Adicionalmente, la pérdida de p53 parece interferir con la apoptosis inducida por otros estímulos, como la privación de factores de crecimiento y la privación de oxígeno. Estos efectos de p53 sobre la supervivencia celular se cree que son responsables de la elevada frecuencia de mutaciones de *p53* en los cánceres humanos.

Además de inducir apoptosis, p53 bloquea la progresión del ciclo celular en respuesta al ADN dañado mediante la inducción del inhibidor de Cdk p21 (véase Fig. 16.20). La proteína p21 bloquea la progresión en la fase G_1 a través de la inhibición de los complejos Cdk2/ciclina E, y la resultante detención del ciclo celular permitiendo que el ADN dañado sea reparado antes de su replicación. La pérdida de p53 impide esta detención del ciclo celular inducido por lesiones, desencadenando incrementos de las frecuencias de mutación y una inestabilidad general del genoma celular. Tal inestabilidad genética es una propiedad común a las células cancerosas, y puede contribuir a posteriores alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores durante la progresión tumoral.

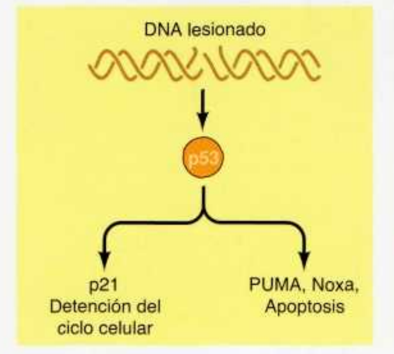


Figura 18.37 Acción de p53. La p53 salvaje (*wild-type*) se requiere para que el ciclo celular se detenga y para la apoptosis inducida por lesión del ADN. La detención del ciclo celular está mediada por la inducción del inhibidor de Cdk p21 y la apoptosis por la inducción de los miembros de la familia proapoptótica Bcl-2 PUMA y Noxa.

Igualmente, los productos de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, que están implicados en algunas formas de cáncer hereditario de mama y de ovario, parecen participar en el control de los puntos de chequeo de la progresión del ciclo celular y la reparación de las roturas de doble hebra en el ADN. Por tanto, *BRCA1* y *BRCA2* funcionan como **genes de estabilidad**, que actúan para mantener la integridad del genoma. Las mutaciones en genes de este tipo dan lugar al desarrollo de cáncer no como resultado de efectos directos sobre la proliferación o supervivencia celular sino porque su inactivación da lugar a una elevada frecuencia de mutaciones en oncogenes o en genes supresores de tumores. Otros genes de estabilidad cuya pérdida contribuye al desarrollo del cáncer en el hombre incluyen al gen *ATM*, que actúa en el punto de control de lesiones en el ADN (véase Fig. 16.19), los genes de reparación del apareamiento incorrecto que son defectuosos en algunos cánceres colorrectales hereditarios (véase Cap. 6, Medicina Molecular), y los genes de reparación por escisión nucleotídica que están mutados en el xeroderma pigmentoso (véase Fig. 6.23).

Como se comenta en los Capítulos 7 y 8, actualmente se considera que los microARN (ARNmi) son unos reguladores destacados de la expresión génica en las células eucarióticas. En las células animales, los ARNmi intervienen después de la transcripción a nivel del ARNm para inhibir la traducción y/o inducir la degradación de moléculas de ARNm (véase Fig. 8.19). Se cree que los ARNmi participan en la regulación de, al menos, una tercera parte de los genes que codifican proteínas, por lo que es muy posible que estén implicados en el desarrollo tumoral. La expresión de ARNmi en muchos tumores presenta ciertas alteraciones características en comparación con las células normales, lo que concuerda con esta noción. Por lo general, la expresión de los ARNmi es significativamente más baja en las células tumorales, lo que indica que muchas de estas moléculas podrían actuar como supresores de tumores. Los resultados de algunos trabajos recientes han respaldado esta hipótesis, ya que la interferencia con la síntesis de ARNmi incrementa la tasa de transformación celular y desarrollo tumoral. *let-7*, una proteína que actúa sobre oncogenes como *rasK* y c-*myc* es un ejemplo de una molécula de ARNmi con actividad supresora de tumores (Fig. 18.38). p53 induce otra molécula de ARNmi que actúa como supresor tumoral (*miR-34*) y actúa a nivel de moléculas de ARNm que codifican varias proteínas que estimulan la progresión del ciclo celular (p. ej., Cdk4, Cdk6 y ciclina E) y favorecen la supervivencia celular (como Bcl-2). No obstante, no todos los ARNmi poseen actividad supresora de tumores, ya que algunos pueden actuar como oncogenes. Por ejemplo, los ARNmi conocidos como *miR-17-92* se amplifican en varios tipos tumorales y actúan sobre ARNm que codifican proteínas que inhiben la progresión del ciclo celular (p. ej., el inhibidor de Cdk p21) o favorecen la apoptosis (como el miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 Bim)

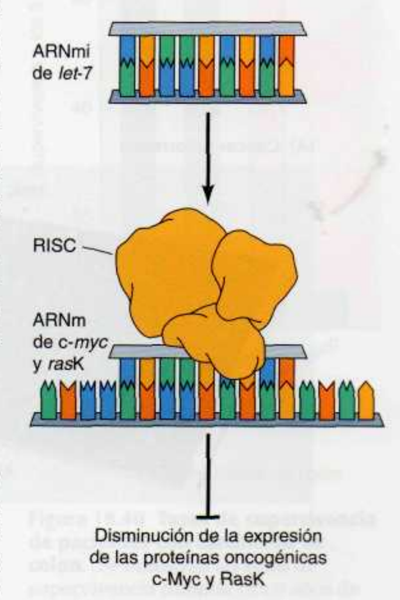


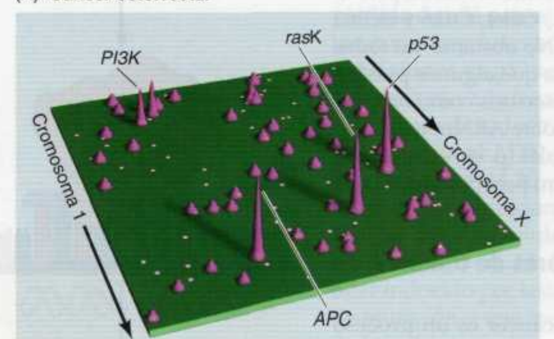
Figura 18.38 Acción supresora tumoral del ARNmi de *let-7*. El ARNmi de *let-7* actúa sobre ARNm que codifican las proteínas oncogénicas c-Myc y RasK.

Papel de los oncogenes y de los genes supresores de tumores en el desarrollo del tumor

Como ya se trató anteriormente, el desarrollo del cáncer es un proceso multietapa en el que las células sanas progresan de manera gradual hasta convertirse en células cancerosas. La secuencia completa de los procesos que se requieren para el desarrollo de cualquier cáncer humano todavía no se conoce, pero está claro que tanto la activación de los oncogenes como la inactivación de los genes supresores de tumores son pasos críticos en la iniciación y progresión del tumor. A la larga, el daño acumulado en varios genes es el responsable del aumento de la capacidad de proliferar, de invadir otros tejidos y de generar metástasis, característico de las células cancerosas.

En algunos trabajos recientes se ha aplicado la secuenciación genómica a gran escala para analizar las mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores que aparecen en un gran número de tumores diferentes que representan varios tipos de neoplasias, como cáncer de mama, colon y pulmón. Por ejemplo, Bert Vogelstein y cols. han calculado las frecuencias de mutaciones en todos los genes que codifican proteínas en 100 tumores colorrectales diferentes. En cada tumor se identificó un promedio de 15 mutaciones que afectaban a genes posiblemente implicados en el desarrollo tumoral. No obstante, tan solo una pequeña proporción de los genes portaba mutaciones de manera uniforme en una parte importante de los tumores, como los oncogenes *ras*K y *PI3K* y los genes supresores de tumores *APC* y *p53* (Fig. 18.39A). Se detectaron mutaciones en otros genes con una frecuencia inferior, normalmente en menos del 5% de cada tipo tumoral. Se ha identificado un patrón similar de mutaciones en los tumores mamarios, los cuales contenían un promedio de 14 mutaciones relacionadas con el desarrollo del cáncer, como mutaciones frecuentes en *p53* y *PI3*K, además de mutaciones menos frecuentes en muchos otros genes (Fig. 18.39B).

Cabe destacar que una misma vía de señalización puede verse afectada por distintas mutaciones en tipos tumorales diferentes, de modo que las mutaciones en distintos oncogenes y genes supresores de tumores pueden ejercer unos efectos semejantes en el desarrollo tumoral. Por ejemplo, algunos tumores de colon portan mutaciones que provocan la activación de un miembro de la familia de oncogenes *raf* (B-*raf*) en lugar de mutaciones de *ras*K. Dado que Raf se encuentra inmediatamente debajo de Ras, la activación de *ras*K o B-*raf* induce la señalización mediada por ERK en las células tumorales. De manera similar, en los tumores de colon se observa a menudo la inactivación de APC (que pertenece a la vía de señalización de Wnt; véase Fig. 18.27), que suele representar un acontecimiento temprano en el desarrollo tumoral. Sin embargo, en algunos tumores la activación de la vía de Wnt obedece a la presencia de mutaciones en el gen que codifica a la β-catenina (que se encuentra corriente debajo de APC en la vía de Wnt) en lugar de a mutaciones en el gen *APC*. De igual modo, la activación de la vía de la PI-3 quinasa depende tanto de mutaciones en *PI3K* (las cuales son pre-



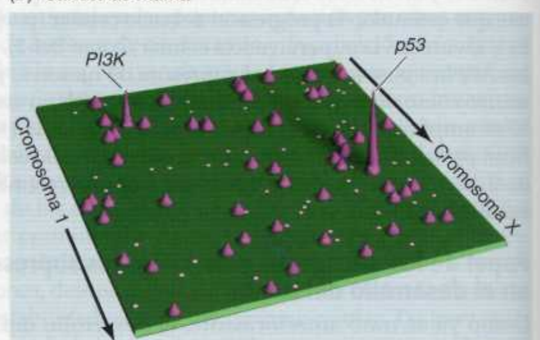


Figura 18.39 Alteraciones genéticas en los carcinomas colorrectales y mamarios. La frecuencia de mutaciones en genes asociados al desarrollo de carcinomas colorrectales (A) y mamarios (B) se representa con arreglo a la posición cromosómica de los genes, comenzando por el brazo corto del cromosoma 1 en el cuadrante superior izquierdo y continuando en el sentido de la flecha. Las posiciones que siguen al límite delantero de la gráfica continúan en la siguiente fila en el borde trasero y los cromosomas se alinean de extremo a extremo. El valor máximo de cada posición corresponde a la frecuencia de mutación del gen. (Tomado de L.D. Wood et al, 2007, *Science* 318: 1108.)

valentes en los tumores de mama y colon) como de mutaciones en *PTEN* u otros genes situados corriente debajo de la PI 3-quinasa.

Por consiguiente, la acumulación de un gran número de mutaciones distintas en los tumores puede incidir en un número más reducido de vías complementarias de señalización encargadas de regular la proliferación y la supervivencia de la célula. Los daños acumulados en varios oncogenes y genes supresores de tumores en estas vías reguladoras distintas podría provocar la desaparición progresiva del control de la proliferación que hace posible el desarrollo de tumores.

Enfoques moleculares para el tratamiento del cáncer

Se ha aprendido mucho acerca de los defectos moleculares responsables del desarrollo de muchos cánceres humanos. Sin embargo, el cáncer es algo más que un tema de interés científico. Es una enfermedad terrible que causa la muerte de cerca de uno de cada cuatro americanos. Por tanto, aplicar nuestro conocimiento del cáncer para mejorar la prevención y el tratamiento del mismo representa un reto fundamental en la investigación actual y futura. Afortunadamente, los avances en la caracterización de la biología molecular del cáncer comienzan a contribuir al desarrollo de nuevos abordajes en su prevención y tratamiento, lo que en último término permitirá hacer frente a la enfermedad de una manera más adecuada.

Prevención y detección precoz

La manera más efectiva de hacer frente al cáncer sería evitar el desarrollo de la enfermedad. La segunda mejor manera, pero también efectiva, sería detectar de manera fiable el tumor antes de que alcanzara la etapa de carácter maligno, de tal manera que pudiera ser tratado. Muchos cánceres se pueden curar mediante tratamientos locales, como la cirugía o la irradiación, siempre y cuando se detecten antes de que se propaguen por metástasis por todo el cuerpo. Por ejemplo, las etapas premalignas del cáncer de colon (adenomas) se suelen curar por completo mediante procedimientos quirúrgicos menores (Fig. 18.40). La tasa de curación de los carcinomas tempranos que todavía permanecen en su lugar de origen también es elevada, menos del 90%. Sin embargo, la tasa de supervivencia disminuye a cerca del 70% para aquellos pacientes cuyo cáncer se ha difundido a los tejidos adyacentes y a los nódulos linfáticos, y es alrededor del 10% para aquellos pacientes con cáncer de colon metastásico. Por tanto, la detección precoz del cáncer es un factor determinante en las consecuencias de la enfermedad.

La principal aplicación de la biología molecular a la prevención y a la detección precoz consiste en identificar a aquellos individuos que tienen una tendencia hereditaria a desarrollar el cáncer. Esta tendencia hereditaria se debe a mutaciones en los genes supresores de tumores, en al menos algún oncogén (*ret* y *cdk4*), así como en los genes de reparación del ADN, como en los genes reparadores *BRCA1* y *BRCA2* de bases desapareadas; esta última mutación es la responsable del cáncer de colon no polipoide hereditario (véase Medicina Molecular en el Cap. 6). Las mutaciones en estos genes se pueden detectar mediante una prueba genética, lo que permite identificar a los individuos de alto riesgo antes de que la enfermedad se desarrolle.

Además de contribuir a la toma de decisiones en el ámbito de la planificación familiar, el seguimiento riguroso de aquellos individuos de alto riesgo permitirá la detección precoz y un tratamiento más efectivo de algunos tipos de cáncer. Por ejemplo, los adenomas de colon se pueden detectar por colonoscopia y se pueden extirpar antes de que se conviertan en tumores malignos. Los pacientes con poliposis adenomatosa familiar (debido a mutaciones hereditarias en el gen supresor de tumores *APC*) suelen desarrollar

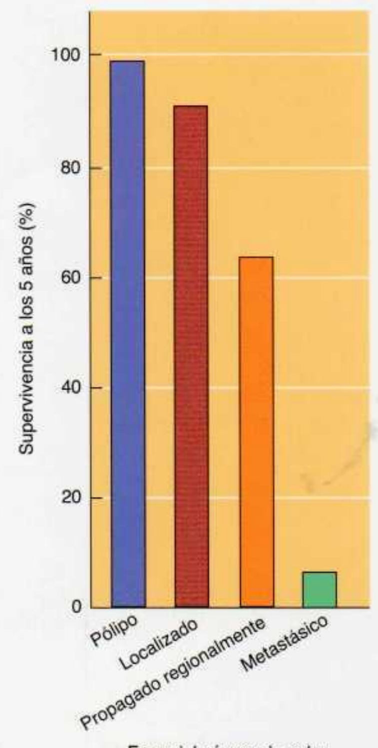


Figura 18.40 Tasas de supervivencia de pacientes con carcinoma de colon. Se muestran las tasas de supervivencia durante cinco años de pacientes a los que se les diagnosticó adenomas (pólipos), carcinomas localizados en su lugar de origen, carcinomas que se habían propagado a tejidos adyacentes y nódulos linfáticos, y carcinoma metastásico.

cientos de adenomas en sus primeros 20 años de vida, por lo que el colon de estos pacientes se suele extirpar antes de que alguno de estos pólipos progrese hasta un estado de tumor maligno. Sin embargo, los pacientes con cáncer de colon no polipoide hereditario desarrollan un menor número de pólipos en momentos posteriores de la vida, por lo que se pueden beneficiar de la colonoscopia rutinaria y de determinadas drogas, como por ejemplo las drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAID), que inhiben el desarrollo del cáncer de colon.

La herencia de cánceres debidos a alteraciones en genes conocidos es un hecho poco frecuente, constituyendo cerca del 5% de la incidencia total del cáncer. El tipo de cáncer con una tendencia hereditaria más común es el cáncer de colon no polipoide hereditario, que contabiliza cerca del 15% de los cánceres de colon y del 1% al 2% de todos los cánceres en Estados Unidos. Las mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2* también son bastante comunes, y contabilizan el 5% de todos los cánceres de mama. Sin embargo, algunos genes que producen un aumento de la tendencia a contraer cáncer podrían intervenir en el desarrollo de un grupo más amplio de tumores malignos frecuentes de adultos. En algunos estudios recientes de asociación genómica (véase Fig. 5.35) se han identificado algunos genes que confieren un riesgo mayor de desarrollo de cáncer de mama y de próstata. La identificación de estos genes que confieren susceptibilidad al cáncer constituye una empresa importante con consecuencias prácticas evidentes. A los individuos con estos genes se les aconsejaría que evitaran su exposición a carcinógenos importantes (p. ej., el humo del tabaco en el caso del cáncer de pulmón) y se les realizaría un seguimiento riguroso para detectar los tumores en etapas tempranas, de tal manera que pudieran ser tratados más fácilmente. La identificación fehaciente de los individuos susceptibles, seguida de unas medidas de detección y preventivas adecuadas, podrían en último término disminuir de manera importante la mortalidad por cáncer.

Diagnóstico molecular

El análisis molecular de los oncogenes y los genes supresores de tumores presentes en ciertos tipos tumorales podría aportar información de utilidad para el diagnóstico del cáncer y para el seguimiento de la eficacia terapéutica. Así, ya se están poniendo en práctica varias aplicaciones de este tipo de diagnóstico molecular. En algunos casos, las mutaciones de los oncogenes han proporcionado marcadores moleculares útiles para seguir el curso de la enfermedad durante su tratamiento. Un buen ejemplo es la translocación de *abl* en la leucemia mielogénica crónica. Como ya se trató anteriormente, esta translocación provoca la fusión de *abl* con el gen *bcr*, lo que produce la expresión de la proteína oncogénica Bcr/Abl (véase Fig. 18.23). A través del método de la reacción en cadena de la polimerasa (véase Fig. 4.23) se puede detectar el oncogén *bcr/abl* recombinante en las células leucémicas, por lo que se utiliza para monitorizar la respuesta de los pacientes al tratamiento.

En otros casos, la detección de mutaciones en determinados oncogenes o en genes supresores de tumores proporciona información acerca de qué opciones terapéuticas elegir. Por ejemplo, el que se hayan amplificado N-*myc* en los neuroblastomas y *erb*B-2 en los carcinomas de mama y de ovario permite predecir una progresión rápida de la enfermedad. Por tanto, los pacientes con estos oncogenes amplificados deberían recibir un tratamiento más agresivo. Como se describe en la siguiente sección, las mutaciones en oncogenes específicos, como *erb*B, también pueden dictar la respuesta de los tumores a los principios activos dirigidos contra oncogenes.

Además del análisis de genes individuales, puede obtenerse información diagnóstica importante a partir del análisis global de la expresión génica en

los cánceres. El uso de *microarrays* de ADN permite analizar simultáneamente la expresión de decenas de miles de genes (véase Fig. 4.27), de modo que es posible desarrollar una clasificación molecular de los cánceres mediante la comparación de los perfiles de expresión génica de los diferentes tumores. Estudios de este tipo sugieren que los análisis de perfiles de expresión génica pueden distinguir entre tumores que de otro modo resultan similares, y proporciona información que predice el resultado clínico y la respuesta al tratamiento. La caracterización de los tumores mediante el análisis del perfil de expresión génica se está convirtiendo, por tanto, en una herramienta práctica para el diagnóstico del cáncer.

Tratamiento

Sin embargo, la cuestión fundamental es saber si el descubrimiento de los oncogenes y de los genes supresores de tumores dará lugar al desarrollo de nuevos medicamentos que actúen selectivamente contra las células cancerosas. La mayoría de los medicamentos que se utilizan actualmente en el tratamiento del cáncer, bien dañan el ADN, o bien inhiben la replicación del ADN. Por tanto, estos medicamentos no sólo son tóxicos para las células cancerosas, sino también para las células sanas, especialmente para aquellas células sanas que experimentan una división celular rápida (p. ej., células hematopoyéticas, células epiteliales del tracto gastrointestinal y células del folículo piloso). La acción de los medicamentos anticancerosos contra estas poblaciones de células sanas es la responsable de la mayor parte de la toxicidad asociada a estos medicamentos, y limita su efectividad en el tratamiento del cáncer.

Un nuevo abordaje prometedor a la terapia del cáncer es la utilización de drogas que inhiben el crecimiento del tumor interfiriendo con la angiogénesis (la formación de los vasos sanguíneos), o desorganizando los vasos sanguíneos del tumor, en lugar de actuar directamente contra las células cancerosas. Como ya se mencionó anteriormente en este capítulo, se necesita que se formen nuevos vasos sanguíneos para suministrar el oxígeno y los nutrientes que se requieren para el crecimiento del tumor. Por tanto, para el desarrollo del tumor es fundamental promover la angiogénesis, y las células tumorales secretan determinados factores de crecimiento, incluido el VEGF, que estimulan la proliferación de las células endoteliales de los capilares, lo que origina el crecimiento de nuevos capilares en el tumor (véase Fig. 17.15). La importancia de la angiogénesis la reconoció por primera vez Judah Folkman en 1971, y las investigaciones llevadas a cabo por Folkman y cols. han conducido al desarrollo de nuevos medicamentos (endostatina y angiostatina) que inhiben la angiogénesis bloqueando la proliferación de las células endoteliales. Puesto que estos medicamentos actúan de manera específica inhibiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos, son mucho menos tóxicos para las células sanas que los agentes anticancerosos estándar. Los inhibidores de la angiogénesis han dado resultados muy prometedores en pruebas llevadas a cabo con animales, y actualmente están siendo sometidos a ensayos clínicos para evaluar su efectividad contra los cánceres humanos. En 2004, resultados clínicos positivos dieron lugar a que la Administración de Alimentos y Medicamentos Americana (FDA: *Food and Drug Administration*) aprobase el uso del primer inhibidor de la angiogénesis, un anticuerpo monoclonal contra VEGF, para el tratamiento del cáncer de colon. Los resultados de otros estudios acerca de esta actividad monoclonal frente al cáncer han sido prometedores y se ha autorizado el tratamiento del cáncer de riñón con dos pequeños inhibidores del receptor de VEFG (sunitinib y sorafenib).

Una estrategia alternativa para conseguir un tratamiento más selectivo del cáncer consiste en desarrollar drogas dirigidas específicamente contra los oncogenes que producen el crecimiento del tumor. Desgraciadamente,

Tabla 18.6 Terapias selectivas basadas en los oncogenes aprobadas para uso clínico

Fármaco	Oncogén	Tipos de tumor
Ácido retinoico	*PML/RARα*	Leucemia promielocítica aguda
Herceptina	*erb*B-2	Cáncer de mama
Erbitux	*erb*B	Cáncer colorrectal
Imatinib	*abl*	Leucemia mieloide crónica
	kit	Tumores estromales gastrointestinales
	PDGFR	Tumores estromales gastrointestinales, leucemia mielomonocítica crónica, síndrome hipereosinofílico, dermatofibrosarcoma protuberante
Gefitinib	*erb*B	Cáncer de pulmón
Erlotinib	*erb*B	Cáncer de pulmón
Sorafenib[a]	*raf*	Cáncer de riñón

[a] Aunque el sorafenib es un potente inhibidor de las quinasas Raf, también inhibe el receptor VEGF y otras tirosina quinasas, por lo que la base molecular de su efecto antitumoral no ha sido establecida.

desde el punto de vista del tratamiento del cáncer, los oncogenes no son exclusivos de las células tumorales. Puesto que los proto-oncogenes desempeñan un papel importante en las células sanas, es probable que los inhibidores generales de la función o de la expresión de los oncogenes actúen contra las células sanas así como contra las células tumorales. Por tanto, la utilidad de los oncogenes como dianas de las drogas anticancerosas no resulta evidente, pero algunos avances prometedores indican que puede ser posible desarrollar terapias selectivas basadas en los oncogenes (Tabla 18.6).

El primer régimen terapéutico dirigido contra un oncogén específico se utiliza para tratar la leucemia promielocítica aguda. Esta leucemia se caracteriza por una translocación cromosómica en la que el gen que codifica el receptor del ácido retinoico (*RARα*) se une a otro gen (*PML*) para dar lugar al oncogén *PML/RARα*. Se cree que funciona como un represor de la transcripción que bloquea la diferenciación celular. Sin embargo, estas células leucémicas se diferencian en respuesta al tratamiento con dosis altas de ácido retinoico, que parece que supera el efecto inhibidor de la proteína oncogénica PML/RARα. Este tratamiento con el ácido retinoico provoca la remisión de la leucemia en la mayoría de los pacientes, aunque esta respuesta favorable es temporal, y los pacientes vuelven a recaer. Sin embargo, el tratamiento combinado con ácido retinoico y con agentes quimioterapéuticos estándar reduce de manera significativa la incidencia de la recaída, por lo que la utilización del ácido retinoico resulta beneficiosa en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda. La actividad terapéutica del ácido retinoico se detectó antes de que fuera identificado el oncogén *PML/RARα*, por lo que su efectividad contra las células leucémicas que expresan esta proteína oncogénica se descubrió por casualidad, en vez de mediante un diseño racional del medicamento. De todas maneras, la utilización del ácido retinoico en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda proporciona el primer ejemplo de un medicamento clínicamente útil dirigido contra una proteína oncogénica.

La herceptina, un anticuerpo monoclonal frente a la proteína oncogénica ErbB-2, fue la primera droga desarrollada frente a un oncogén específico que consiguió la aprobación de la FDA para su uso clínico en el tratamiento del cáncer. La proteína ErbB-2 se sobreexpresa en aproximadamente el 25% al 30% de los cánceres de mama como resultado de la amplificación del gen *erb*B-2. En primer lugar se encontró que un anticuerpo frente al dominio extracelular de ErbB-2 (un receptor proteína-tirosina quinasa) inhibía la proliferación de células tumorales en las que se sobreexpresaba ErbB-2. Estos re-

sultados llevaron al desarrollo y ensayo clínico de la Herceptina, que se encontró que reducía significativamente el crecimiento tumoral y prolongaba la supervivencia del paciente, en ensayos clínicos que incluían a más de 600 mujeres con cáncer de mama metastático en el que se sobreexpresaba la proteína ErbB-2. Basándose en estos resultados, la Herceptina fue aprobada por la FDA en 1998 para el tratamiento del cáncer de mama metastático que expresase niveles elevados de ErbB-2. Erbitux, un anticuerpo monoclonal contra el receptor de EGF (la proteína del oncogén ErbB-2), también fue aprobado por la FDA en el 2004 para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado y, más recientemente, en tumores de cabeza y cuello.

El uso terapéutico de anticuerpos monoclonales está limitado a las dianas extracelulares, como los factores de crecimiento o los receptores de superficie celulares. Un área de aplicación más amplia de desarrollo de principios activos es la identificación de inhibidores de proteínas oncogénicas de pequeño tamaño molecular, incluyendo las proteínas quinasas que juegan papeles clave en la señalización de la proliferación y supervivencia de las células cancerosas. El avance pionero en esta área fue el desarrollo de un inhibidor *selectivo de la proteína-tirosina quinasa Bcr/Abl, que es generado* por la translocación cromosómica Philadelphia en la leucemia mieloide crónica (véase Fig. 18.23). Brian Druker y cols. desarrollaron un inhibidor potente y específico de la proteína quinasa Bcr/Abl y demostraron que este compuesto (denominado imatinib o Gleevec) bloquea de forma eficaz la proliferación de las células de leucemia mieloide crónica. Basándose en estos resultados, un ensayo clínico del imatinib fue iniciado en 1998. Las respuestas a imatinib fueron notables, y el principio activo tenía efectos secundarios mínimos. El llamativo éxito del imatinib en estos estudios clínicos sirvió como base para la rápida aprobación por la FDA en 2001 de su uso para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica. A pesar de que algunos pacientes recaen y desarrollan resistencia frente al principio activo, el imatinib es indudablemente una terapia altamente eficaz para esta leucemia. Interesantemente, la resistencia a imatinib en la mayoría de los casos resulta de mutaciones en el dominio quinasa de la proteína Bcr/Abl que impiden la unión del imatinib. Mediante el análisis de estos mutantes resistentes, ha sido posible diseñar nuevos inhibidores, que están actualmente en ensayos clínicos para determinar su eficacia contra leucemias que se han hecho resistentes al imatinib.

El imatinib es también un potente inhibidor del receptor de PDGF y de las proteína-tirosina quinasas Kit, y se ha demostrado que resulta una terapia eficaz para tumores en los que los genes que codifican para estas proteína quinasas son oncogenes activados mutacionalmente. *Kit* es activado en aproximadamente un 90% de los tumores de estroma gastrointestinal, que son tumores del tejido conectivo estromal del estómago e intestino delgado. Muchos de los tumores de estroma gastrointestinal que no poseen mutaciones activadoras de Kit, poseen en su lugar mutaciones activadoras del receptor de PDGF. Como consecuencia, los tumores de estroma gastrointestinal responden con fuerza al imatinib. Adicionalmente, el imatinib es activo frente a otros tres tipos de tumores en los que el receptor de PDGF está activado como oncogén, incluyendo la leucemia mielomonocítica crónica en el *que es activado mediante fusión con el factor de transcripción* Tel (véase Fig. 18.25).

Dos inhibidores de pequeño tamaño molecular del receptor del EGF (gefitinib y erlotinib) han mostrado recientemente una llamativa actividad contra un subgrupo de cánceres de pulmón en los que el receptor de EGF está activado por mutaciones puntuales. Resulta notable que la idea de tratar cánceres de pulmón con gefitinib fue el hecho de que estos inhibidores de EGF están sobreexpresados en la mayoría de los cánceres de pulmón, en



MEDICINA MOLECULAR

Imatinib: Tratamiento del cáncer dirigido contra el oncogén bcr/abl

Enfermedad

La leucemia mieloide crónica (LMC) constituye aproximadamente el 12% de las leucemias en adultos. En 2007, se estimó que aproximadamente 4.600 casos de CML serían diagnosticados en Estados Unidos, y que habría unas 500 muertes causadas por esta enfermedad.

La LMC se origina a partir de una célula madre pluripotencial en la médula ósea. Es una enfermedad de desarrollo lento, que se divide clínicamente en dos etapas: la fase crónica y la crisis blástica. La fase crónica de la LMC puede persistir durante años y se asocia con una sintomatología mínima. Finalmente, sin embargo, los pacientes progresan hacia un estado agudo de la enfermedad que pone en peligro su vida, conocido como crisis blástica. La crisis blástica se caracteriza por la acumulación de grandes números de células leucémicas que proliferan rápidamente, denominadas blastos. Los pacientes que sufren la crisis blástica se tratan con drogas quimioterapéuticas estándar, que pueden inducir una remisión a la fase crónica de la enfermedad. La quimioterapia también puede utilizarse durante la fase crónica de la LMC, pero generalmente no consigue eliminar las células leucémicas. La LMC también puede tratarse mediante un trasplante de células madre de la médula ósea, lo que puede resultar curativo en aproximadamente la mitad de los pacientes en la fase crónica de la enfermedad.

Base molecular y celular

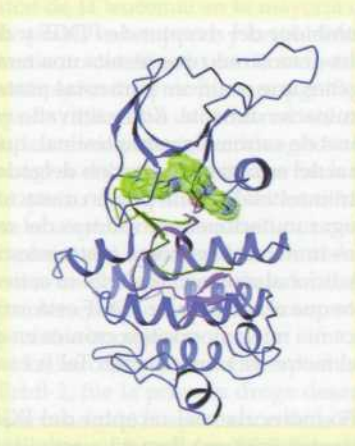
La activación del oncogén *abl* por la translocación desde su locus normal en el cromosoma 9 al cromosoma 22, es un suceso altamente reproducible en la LMC, ocurriendo en el 95% de estas leucemias. Esta translocación resulta en la formación de una fusión entre el gen *abl* y el gen *bcr* del cromosoma 22, dando lugar al oncogén *bcr/abl*. El oncogén expresa una proteína de fusión Bcr/Abl en la que la secuencia de aminoácidos Bcr sustituye al primer exón de Abl (véase Fig. 18.23). La proteína Bcr/Abl es una proteína-tirosina quinasa constitutivamente activa, que desencadena una leucemia mediante la activación de una serie de vías de señalización.

Puesto que la activación del oncogén *bcr/abl* es un evento tan reproducible en el desarrollo de la LMC, parecía ser un buen candidato contra el que desarrollar un inhibidor selectivo de tirosina-quinasas que podría ser de utilidad clínica. Estos estudios dieron lugar al desarrollo del imatinib (también conocido como Gleevec) como la primera droga terapéutica diseñada con éxito como inhibidor selectivo de una proteína oncogénica.

Prevención y tratamiento

El desarrollo del imatinib empezó con la identificación de la 2-fenilo-aminopirimidina como un inhibidor inespecífico de proteínas quinasas. A continuación, fueron sintetizados una serie de compuestos relacionados, y fueron optimizados en base a su actividad frente a distintas dianas, incluyendo la tirosina quinasa Abl. Entre muchos compuestos analizados en estas investigaciones, se encontró que el imatinib era un inhibidor potente y específico de Abl, y de otras dos proteína-tirosina quinasas, el receptor del factor de crecimiento plaquetario y c-Kit. Estudios sucesivos, demostraron que el imatinib inhibía específicamente la proliferación de células transformadas por oncogenes *bcr/abl*, incluyendo células de pacientes con LMC, en cultivo. Además, el imatinib[BD4] impedía la formación de tumores por parte de células transformadas con *bcr/abl* en ratones. Por el contrario, las células normales o células transformadas con otros oncogenes, no eran afectadas por el imatinib[BD4], demostrando su especificidad frente a la tirosina quinasa Bcr/Abl.

Basándose en estos resultados, se inició la fase I del ensayo clínico de imatinib en junio de 1998. Los resultados fueron sorprendentemente positivos. De los 54 pacientes en fase crónica tratados con imatinib, 53 respondieron a la droga. Es más, la respuesta al imatinib[BD4] se observó en más de la mitad de los pacientes en crisis blástica tratados. El éxito de estos estudios iniciales incitó una fase II expandida que incluía a más de 1.000 pacientes. Estos estudios confirmaron los resultados prometedores de la fase I, donde el 95% de los pacientes en fase crónica y aproximadamente el 50% de los pacientes en crisis blástica, respondieron al imatinib. Además, al contrario que las drogas quimioterapéuticas convencionales, el imatinib poseía efectos secundarios mínimos. Estos estudios clínicos claramente demostraron que el imatinib es una terapia altamente eficaz para la LMC, y dio lugar a una aprobación acelerada del imatinib por parte de la FDA en mayo del 2001 —un hito en la traducción de la ciencia básica en práctica clínica.



Estructura cristalina del dominio catalítico de Abl formando un complejo con un derivado del imatinib. (De T. Schindler, W. Bornmann, P. Pellicena, W. T. Miller, B. Clarkson y J. Kuriyan. 2000. *Science* 289: 1938.)

Referencia

Druker, B. J. 2002. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene* 21: 8541-8546.

lugar del hecho de que pueden ser activados mediante mutaciones en oncogenes. Al contrario que la eficacia general del imatinib frene a la leucemia mieloide crónica, los estudios clínicos indicaron que gefitinib o erlotinib fueron eficaces en sólo un 10% de los pacientes de cáncer de pulmón, aunque las respuestas en estos pacientes era bastante dramática. Un avance importante se hizo en 2004 cuando dos grupos de investigadores encontraron que el subgrupo de cánceres de pulmón que respondían a gefitinib eran estos inhibidores en los que las mutaciones puntuales resultaban en la activación constitutiva del receptor tirosina quinasa para EGF (Fig. 18.41). Estos resultados indicaban que la inhibición del receptor de EGF era un tratamiento efectivo para aquellos tumores en los que había sido mutado para actuar como un oncogén pero en aquellos que expresaban la proteína normal.

El descubrimiento de que gefitinib y erlotinib son activos sólo frente a aquellos cánceres de pulmón con receptores de EGF activados mutacionalmente, apoya la hipótesis de que los tumores con oncogenes activados son especialmente susceptibles a inhibidores de esos oncogenes. Esto es también consistente con la actividad de imatinib contra tumores que expresan proteínas oncogénicas mutacionalmente activadas de Bcr/Abl, Kit, y el receptor de PDGF, además de con una diversidad de experimentos en sistemas de modelos animales. La sensibilidad de los tumores a la inhibición de oncogenes activados se ha denominado **adicción oncogénica**. Se cree que un oncogén activado se convierte en uno de los principales motores en la célula tumoral, de modo que otras vías de señalización en la célula tumoral se hacen secundarias. Como consecuencia, la proliferación y supervivencia de una célula tumoral puede convertirse hacerse dependiente de la actividad continuada del oncogén, mientras que las células normales tienen vías de señalización alternativas que pueden compensar si alguna de las vías es bloqueada.

Los ejemplos de imatinib, gefitinib y erlotinib sugieren claramente que la explotación continuada de los oncogenes como dianas para el desarrollo de principios activos que actúen selectivamente contra las células cancerosas. De hecho, una amplia variedad de principios activos dirigidos contra proteínas oncogénicas (incluyendo B-Raf, PI-3 quinasa, y Akt) y componentes corriente abajo de las vías de señalización oncogénicas (como MEK y mTOR) están siendo ensayados para evaluar su potencial en el tratamiento de cáncer en el hombre. La aparente dependencia de las células de cáncer de oncogenes mutacionalmente activados ofrece la promesa de que el uso de principios activos dirigidos contra los oncogenes en combinación con el análisis genético de los tumores de los pacientes individuales puede dar lugar a grandes avances en el tratamiento del cáncer. A pesar de que el eventual impacto de la biología molecular sobre el tratamiento del cáncer sigue estando en el futuro está claro que el diseño racional de principios activos dirigidos contra proteínas oncogénicas específicas jugará un papel importante.

Figura 18.41 Mutaciones del receptor de EGF asociadas con la sensibilidad al gefitinib y erlotinib. Los cánceres de pulmón que responden al gefitinib y erlotinib poseen mutaciones activadoras exones 18-21 del dominio quinasa del receptor de EGF. Entre ellos figuran mutaciones puntuales como G719C (exón 18), V765A (exón 20) y L858R (exón 21), sí como deleciones cortas, como ΔE746-A750 en el exón 19.

RESUMEN

DESARROLLO Y CAUSAS DEL CÁNCER

Tipos de cáncer: El cáncer se debe a la proliferación incontrolada de cualquier tipo de célula. La distinción más importante, para el paciente, es entre tumores benignos, que permanecen en el lugar de origen, y tumores malignos, que pueden invadir el tejido circundante sano y diseminarse por el organismo.

PALABRAS CLAVE

cáncer, tumor, tumor benigno, tumor maligno, metástasis, carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma

PALABRAS CLAVE	RESUMEN
iniciación del tumor, progresión del tumor, adenoma, pólipo	*Desarrollo del cáncer:* Los tumores se desarrollan a partir de una única célula alterada que comienza a proliferar de manera anormal. Mutaciones adicionales darán lugar a la selección de aquellas células con una mayor capacidad de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis.
carcinógeno, promotor tumoral	*Causas del cáncer:* La radiación y muchos otros carcinógenos químicos actúan dañando el ADN e induciendo mutaciones. Otros carcinógenos químicos contribuyen al desarrollo del cáncer estimulando la proliferación celular. Los virus también causan cáncer en humanos y en otras especies.
inhibición dependiente de la densidad, estimulación autocrina del crecimiento, inhibición por contacto, angiogénesis, muerte celular programada, apoptosis	*Propiedades de las células cancerosas:* La proliferación incontrolada de las células cancerosas se refleja en que tienen poca necesidad de factores de crecimiento extracelulares, y en la ausencia de la inhibición por contacto célula-célula. Muchas células cancerosas también se diferencian de manera defectuosa, lo que está de acuerdo con su proliferación continua *in vivo.* La incapacidad característica de las células cancerosas de sufrir apoptosis también contribuye de una manera importante al desarrollo del tumor.
transformación celular	*Transformación de las células en cultivo:* El desarrollo de ensayos de transformación celular *in vitro*, ha permitido estudiar la conversión de células sanas en células tumorales, en cultivos celulares.
	VIRUS TUMORALES
virus tumoral, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C	*Virus de la hepatitis B y C:* Los virus de la hepatitis B y C pueden causar cáncer hepático en humanos.
virus de simio 40 (SV40), poliomavirus	*SV40 y poliomavirus:* Aunque ni el SV40 ni el poliomavirus causan cáncer en humanos, son modelos importantes para estudiar la biología molecular de la transformación celular. El antígeno T del SV40 induce la transformación mediante su interacción con las proteínas celulares supresoras de tumores Rb y p53.
papilomavirus	*Papilomavirus:* Los papilomavirus inducen tumores en diversos animales, incluyendo el carcinoma cervical en humanos. Al igual que el antígeno T de SV40, las proteínas transformantes de los papilomavirus interaccionan con Rb y p53.
adenovirus	*Adenovirus:* Los adenovirus no causan cánceres de manera natural en el hombre ni en otras especies, pero son un modelo importante en la investigación del cáncer. Sus proteínas también interaccionan con Rb y p53.
herpesvirus, herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi, virus de Epstein-Barr	*Herpesvirus:* Los herpesvirus, que están entre los virus animales más complejos, provocan el cáncer en varias especies, incluido el hombre.
retrovirus, virus del sarcoma de Rous (RSV)	*Retrovirus:* Los retrovirus causan el cáncer en el hombre y en otros animales. Algunos retrovirus tienen genes específicos responsables de inducir la transformación celular, y a partir de estudios realizados con estos retrovirus altamente oncogénicos se han caracterizado oncogenes virales y celulares.

RESUMEN

ONCOGENES

Oncogenes retrovíricos: El primer oncogén identificado fue el gen *src* del RSV. Estudios posteriores han identificado más de dos docenas de oncogenes distintos en diferentes retrovirus.

Proto-oncogenes: Los oncogenes de los retrovirus se originaron a partir de genes similares de células sanas denominados proto-oncogenes. Los oncogenes son formas de sus correspondientes proto-oncogenes que están mutadas o que se expresan de manera anormal.

Oncogenes en el cáncer en el hombre: En el cáncer en el hombre, diversos oncogenes se activan a partir de mutaciones puntuales, reordenamientos del ADN, y amplificaciones. Algunos de estos oncogenes de tumores humanos, como los genes *ras*, son los homólogos celulares de aquellos oncogenes que se describieron por primera vez en los retrovirus.

Funciones de los productos oncogénicos: La mayoría de las proteínas oncogénicas intervienen como componentes de las vías de señalización que estimulan la proliferación celular. El gen que codifica la ciclina D1 y Cdk4 también es un oncogén potencial, que estimula la progresión del ciclo celular. Otras proteínas oncogénicas interfieren con la diferenciación celular, y los oncogenes que codifican la PI 3-quinasa, Akt y Bcl-2 inhiben la apoptosis.

GENES SUPRESORES DE TUMORES

Identificación de los genes supresores de tumores: A diferencia de los oncogenes, los genes supresores de tumores inhiben el desarrollo del tumor. El prototipo de un gen supresor de tumores, *Rb*, se identificó a partir de los estudios sobre la herencia del retinoblastoma. La pérdida o la inactivación por mutación de *Rb* y de otros genes supresores de tumores, como *p53*, contribuye a que se desarrollen diversos tipos de cáncer en el hombre.

Funciones de los productos de los genes supresores de tumores: Las proteínas codificadas por la mayoría de los genes supresores de tumores intervienen como inhibidores de la proliferación o de la supervivencia celular. Las proteínas Rb, INK4, y p53 son reguladores negativos de la progresión del ciclo celular. Además, p53 se requiere para la apoptosis inducida por lesión del ADN y por otros estímulos, por lo que su inactivación contribuye a estimular la supervivencia de la célula tumoral. Algunos genes, como *BRCA1* y *BRCA2*, actúan para mantener la estabilidad genómica en lugar de influenciar directamente la proliferación celular.

Papel de los oncogenes y de los genes supresores de tumores en el desarrollo del tumor: Las mutaciones en los oncogenes y en los genes supresores de tumores contribuyen al desarrollo progresivo de los cánceres en el hombre. Se considera que la acumulación de los daños en varios de estos genes origina la alteración de la proliferación, diferenciación y supervivencia que caracteriza a la célula cancerosa.

PALABRAS CLAVE

oncogén, *src*, *ras*, *raf*

proto-oncogén

c-*myc*, *abl*, *erb*B-2

Fos, Jun, *CCND*1, ErbA, PML/RARα, PI 3-quinasa, Akt, Bcl-2

gen supresor de tumores, *Rb*, *p53*

PTEN, gen de estabilidad

PALABRAS CLAVE

adicción oncogénica

RESUMEN

ENFOQUES MOLECULARES PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Prevención y detección precoz: Muchos cánceres se pueden curar si se detectan en una etapa temprana del desarrollo del tumor. Las pruebas genéticas para identificar a aquellos individuos que tengan una tendencia hereditaria a desarrollar un cáncer, pueden permitir una detección precoz y un tratamiento más eficaz de los individuos de alto riesgo.

Diagnóstico molecular: La detección de mutaciones en oncogenes y en genes supresores de tumores puede ser útil en el diagnóstico y en el seguimiento de la respuesta al tratamiento. El análisis global de la expresión génica quizás diferencie subclases de cánceres con diferente pronóstico clínico o respuesta a tratamientos.

Tratamiento: El desarrollo de drogas dirigidas contra oncogenes puede conducir a que se descubran nuevos agentes terapéuticos que actúen de manera selectiva contra las células cancerosas.

Preguntas

1. ¿En qué difiere un tumor benigno de un tumor maligno?

2. ¿Cuál es el papel de la selección clonal en el desarrollo del cáncer?

3. ¿Cómo aumentan los estrógenos el riesgo de padecer un cáncer?

4. ¿Cómo contribuye la estimulación autocrina del crecimiento a la progresión de los tumores?

5. ¿Qué propiedades de las células cancerosas les confieren la capacidad de metastatizar?

6. Has construido un antígeno T mutado del SV40 que no puede inducir la transformación celular, ya que no se une a Rb. Si este antígeno T mutado se introdujera en las células junto con un ADNc de papilomavirus que codificara para E6, ¿crees que causaría la transformación de estas células? ¿Y si el ADNc codificara para E7?

7. ¿Por qué los pacientes de SIDA tienen una elevada incidencia de algunos tipos de cáncer?

8. ¿Cómo puede convertirse un protooncogén en un oncogén sin un cambio o una mutación de su secuencia codificante? Explica dos formas en las que podría ocurrir.

9. ¿Qué efecto podría esperarse de la sobreexpresión del producto del gen supresor de tumores *INK4* en células tumorales en las que se ha inactivado *Rb* mediante una mutación?

10. ¿Qué tumores consideras que serían más sensibles al tratamiento con radiación —los tumores con el gen *p53* salvaje *(wild-type)* o con el gen *p53* mutado?

11. ¿Cuál es el modo de acción del imatinib? ¿Cómo desarrollan algunos tumores la resistencia a este principio activo?

12. ¿Qué es la «adicción oncogénica» y por qué es importante este concepto para la selección de dianas moleculares para la terapia contra el cáncer?

Bibliografía

Desarrollo y causas del cáncer

Adams, J. M. and A. Strasser. 2008. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res.* 68: 4018–4021. [R]

Christofori, G. and H. Semb. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24: 73–76. [R]

Colditz, G. A., T. A. Sellers and E. Trapido. 2006. Epidemiology—Identifying the causes and preventability of cancer? *Nature Rev. Cancer* 6: 75–83. [R]

Fialkow, P. J. 1979. Clonal origin of human tumors. *Ann. Rev. Med.* 30: 135–143. [R]

Hanahan, D. and R. A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70. [R]

Kolonel, L. N., D. Altshuler and B. E. Henderson. 2004. The multiethnic cohort study: Exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nature Rev. Cancer* 4: 1–9. [R]

Nguyen, D. X. and J. Massagué. 2007. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nature Rev. Genet.* 8: 341–352. [R]

Nowell, P. C. 1986. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 46: 2203–2207. [R]

Peto, J. 2001. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411: 390–395. [R]

Raff, M. C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397–400. [R]

Steeg, P. S. 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Med.* 12: 895–904. [R]

Temin, H. M. and H. Rubin. 1958. Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in culture. *Virology* 6: 669–688. [P]

Tenen, D. G. 2003. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature Rev. Cancer* 3: 89–101. [R]

Virus tumorales

Boshoff, C. and R. Weiss. 2002. AIDS-related malignancies. *Nature Rev. Cancer* 2: 373–382. [R]

Bouchard, M. J. and R. J. Schneider. 2004. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J. Virol.* 78: 12725–12734. [R]

Coffin, J. M., S. H. Hughes and H. E. Varmus, eds. 1997. *Retroviruses.* Woodbury, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Damania, B. 2004. Oncogenic γ-herpesviruses: Comparison of viral proteins involved in tumorigenesis. *Nature Rev. Microbiol.* 2: 656–668. [R]

Flint, S. J., L. W. Enquist and A. M. Skalka. 2003. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press.

Ganem, D. 2006. KSHV infection and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1: 273–296. [R]

Grassmann, R., M. Aboud and K.-T. Jeang. 2005. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* 24: 5976–5985. [R]

Helt, A.-M. and D. A. Galloway. 2003. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* 24: 159–169. [R]

Hussain, S. P., J. Schwank, F. Staib, X. W. Wang and C. C. Harris. 2007. *TP53* mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 26: 2166–2176. [R]

Knipe, D. M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman and S. E. Straus. 2001. *Fundamental Virology*. 4th ed. New York: Lippincott Williams and Wilkins.

Matsuoka, M. and K.-T. Jeang. 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature Rev. Cancer* 7: 270–280.[R]

Saenz-Robles, M. T., C. S. Sullivan and J. M. Pipas. 2001. Transforming functions of simian virus 40. *Oncogene* 20: 7899–7907. [R]

Woodman, C. B. J., S. I. Collins and L. S. Young. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Rev. Cancer* 7: 11–22. [R]

Young, L. S. and A. B. Rickinson. 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Rev. Cancer.* 4: 757–768. [R]

zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Rev. Cancer* 2: 342–350. [R]

Oncogenes

Adhikary, S. and M. Eilers. 2005. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 635–645. [R]

Albertson, D. G. 2006. Gene amplification in cancer. *Trends Genet.* 22: 447–455. [R]

Altomare, D. A. and J. R. Testa. 2005. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24: 7455–7464. [R]

Blume-Jensen, P. and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411: 355–365. [R]

Clevers, H. 2006. Wnt/β-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469–479. [R]

Danial, N. K. and S. J. Korsmeyer. 2004. Cell death: Critical control points. *Cell* 116: 205–219. [R]

Der, C. J., T. G. Krontiris and G. M. Cooper. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3637–3640. [P]

Dorsam, R. T. and J. S. Gutkind. 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Rev. Cancer* 7:79–94. [R]

Downward, J. 2006. Prelude to an anniversary for the *RAS* oncogene. *Science* 314: 433–434. [R]

Garnett, M. J. and R. Marais. 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 6: 313–319. [R]

Kranenburg, O. 2005. The *KRAS* oncogene: Past, present, and future. *Biochim. Biophys. Acta* 1756: 81–82. [R]

Krontiris, T. G. and G. M. Cooper. 1981. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1181–1184. [P]

Leder, P., J. Battey, G. Lenoir, C. Moulding, W. Murphy, H. Potter, T. Stewart and R. Taub. 1983. Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 222: 765–771. [R]

Martin, G. S. 1970. Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227: 1021–1023. [P]

Massagué, J. 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432: 298–306. [R]

Mitelman, F., B. Johansson and F. Mertens. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Rev. Cancer* 7: 233–245. [R]

Shih, C., L. C. Padhy, M. Murray and R. A. Weinberg. 1981. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 300: 539–542. [P]

Stehelin, D., H. E. Varmus, J. M. Bishop and P. K. Vogt. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170–173. [P]

Tabin, C. J., S. M. Bradley, C. I. Bargmann, R. A. Weinberg, A. G. Papageorge, E. M. Scolnick, R. Dhar, D. R. Lowy and E. H. Chang. 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300: 143–149. [P]

Taipale, J. and P. A. Beachy. 2001. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 411: 349–354. [R]

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med.* 10: 789–799. [R]

Vogt, P. K. 1971. Spontaneous segregation of nontransforming viruses from cloned sarcoma viruses. *Virology* 46: 939–946. [P]

Genes supresores de tumores

Cantley, L. C. and B. G. Neel. 1999. New insights into tumor suppression: *PTEN* suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4240–4245. [R]

Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer. 2004. Cell death: Critical control points. *Cell* 116: 205–219. [R]

Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert and T. P. Dryja. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643–646. [P]

Giacanti, C. and A. Giordano. 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25: 5220–5227. [R]

Hammond, S. M. 2007. MicroRNAs as tumor suppressors. *Nature Genet.* 39: 582–583. [R]

Harris, H., O. J. Miller, G. Klein, P. Worst and T. Tachibana. 1969. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 223: 363–368. [P]

He, L., X. He, S. W. Lowe and G. J. Hannon. 2007. microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nature Rev. Cancer* 7: 819–822. [R]

Kastan, M. B. and J. Bartek. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316–323. [R]

Knudson, A. G. 1976. Mutation and cancer: A statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 820–823. [P]

Lee, W.-H., R. Bookstein, F. Hong, L.-J. Young, J.-Y. Shew and E. Y.-H. P. Lee. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequence. *Science* 235: 1394–1399. [P]

Mendel, J. T. 2008. Myriad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 133: 217–222. [R]

Narod, S. A. and W. D. Foulkes. 2004. *BRCA1* and *BRCA2*: 1994 and beyond. *Nature Rev. Cancer* 4: 665–676. [R]

Pardali, K. and A. Moustakas. 2007. Actions of TGF-β as a tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1775: 21–62. [R]

Salmena, L., A. Carracedo and P. P. Pandolfo. 2008. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 133: 403–414. [R]

Sherr, C. J. 2004. Principles of tumor suppression. *Cell* 116: 235–246. [R]

Taipale, J. and P. A. Beachy. 2001. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 411: 349–354. [R]

Venkitaraman, A. R. 2002. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108: 171–182. [R]

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med.* 10: 789–799. [R]

Vousden, K. H. and X. Lu. 2002. Live or let die: The cell's response to p53. *Nature Rev. Cancer* 2: 594–604. [R]

Wood, L. D. and 41 others. 2007. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318: 1108–1113. [P]

Enfoques moleculares para el tratamiento del cáncer

Baselga, J. 2006. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* 312: 1175–1178. [R]

Downward, J. 2002. Targeting Ras signaling pathways in cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* 3: 11–22. [R]

Easton, D. F. and 104 others. 2007. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447: 1087–1095. [P]

Eeles, R. A. and 48 others. 2008. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nature Genet.* 40: 316–321. [P]

Engelman, J. A. and J. Settleman. 2008. Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18: 73–79. [R]

Faivre, S., G. Demetri, W. Sargent and E. Raymond. 2007. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nature Rev. Drug Discov.* 6: 734–745. [R]

Faivre, S., G. Kroemer and E. Raymond. 2006. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nature Rev. Drug Discov.* 5: 671–688. [R]

Galizia, G., E. Lieto, F. De Vita, M. Orditura, P. Castellano, T. Troiani, V. Imperatore and F. Ciardiello. 2007. Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer. *Oncogene* 26: 3654–3660. [R]

Gschwind, A., O. M. Fischer and A. Ullrich. 2004. The discovery of receptor tyrosine kinases: Targets for cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* 4: 361–370. [R]

Hennessy, B. T., D. L. Smith, P. T. Ram, Y. Lu and G. B. Mills. 2005. Exploiting the PI3K/Akt pathway for cancer drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov.* 4: 988–1003. [R]

Herbst, R. S., M. Fukuoka and J. Baselga. 2004. Gefitinib—A novel targeted approach to treating cancer. *Nature Rev. Cancer* 4: 956–965. [R]

Imai, K. and A. Takaoka. 2006. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Rev. Cancer* 6: 714–727. [R]

Kerbel, R. S. 2006. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science* 312: 1171–1175. [R]

Lallemand-Breitenbach, V., J. Zhu, S. Kogan, Z. Chen and H. de Thé. 2005. How patients have benefited from mouse models of acute promyelocytic leukemia. *Nature* 5: 821–827. [R]

Nahta, R. and F. J. Esteva. 2007. Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene* 26: 3637–3643. [R]

O'Hare, T., A. S. Corbin and B. J. Druker. 2006. Targeted CML therapy: Controlling drug resistance, seeking cure. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 16: 92–99. [R]

Ponder, B. 2001. Cancer genetics. *Nature* 411: 336–341. [R]

Potti, A. and J. R. Nevins. 2008. Utilization of genomic signatures to direct use of primary chemotherapy. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 18: 62–67. [R]

Roberts, P. J. and C. J. Der. 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291–3310. [R]

Sawyers, C. L. 2004. Targeted cancer therapy. *Nature* 432: 294–297. [R]

Sergina, N. V. and M. M. Moasser. 2007. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol. Med.* 13: 527–534. [R]

Sharma, S. V., D. W. Bell, J. Settleman and D. A. Haber. 2007. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Rev. Cancer* 7: 169–181. [R]

Sharma, S. V. and J. Settleman. 2007. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev.* 21: 3214–3231. [R]

Thun, M. J., S. J. Henley and C. Patrono. 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: Mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 252–266. [R]

Varmus, H. 2006. The new era in cancer research. *Science* 312: 1162–1165. [R]

Weinstein, I. B. 2002. Addiction to oncogenes—The Achilles heal of cancer. *Science* 297: 63–64. [R]

Weisberg, E., P. W. Manley, S. W. Cowan-Jacob, A. Hochhaus and J. D. Griffin. 2007. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Nature Rev. Cancer* 7: 345–356. [R]

Wilhelm, S., C. Carter, M. Lynch, T. Lowinger, J. Dumas, R. A. Smith, B. Schwartz, R. Simantov and S. Kelley. 2006. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature Rev. Drug Disc.* 5: 835–844. [R]

Respuestas a las preguntas

CAPÍTULO 1

1. Que las moléculas orgánicas, incluyendo varios aminoácidos, pueden formarse espontáneamente a partir de una mezcla de gases reductores.
2. El ARN es único en su capacidad de servir tanto como molde y de catalizar las reacciones químicas necesarias para su propia replicación.
3. Las mitocondrias y cloroplastos contienen sus propios ADN y mitocondrias, son similares en tamaño a las bacterias y se dividen como las bacterias. Las proteínas ribosómicas y los ARN de estos orgánulos también están más estrechamente relacionados con los de las bacterias que los codificados por los genomas eucariotas.
4. Porque el O_2 se hizo abundante en la atmósfera de la Tierra como resultado de la fotosíntesis.
5. El volumen de una esfera viene definido por la fórmula $4/3\pi r^3$, donde r = radio. Puesto que el volumen de las células es proporcional al cubo de su radio, el volumen relativo de un macrófago comparado con *S. aureus* es la relación entre los cubos de sus radios: $25^3/0{,}5^3 = 125.000$.
6. Levadura.
7. Ratón.
8. El índice de refracción del aire es 1,0; el índice de refracción del aceite es aproximadamente 1,4. Puesto que la resolución = *0,61/η sen α (η es el índice de refracción)*, observar una muestra a través del aire en vez de a través del aceite supone que el límite de resolución varíe de 0,2 µm a 0,3 µm.
9. Resolución = 0,61λ/NA. Tomando λ = 0,5 µm para la luz visible, el objetivo con un NA = 1,3 µm resolverá objetos con una separación de 0,23 µm, mientras que el objetivo de NA = *1,1 resolverá objetos distanciados unos 0,27 µm.* El aumento de las imágenes puede obtenerse mediante otros métodos (como la proyección en una pantalla o empleando una lente ocular con más aumentos). Así, la mejor opción sería un objetivo de ×60 aumentos y una apertura numérica de 1,3.
10. Las proteínas marcadas con GFP pueden expresarse en células vivas, de modo que pueden verse sin necesidad de fijar y matar las células para marcarlas con un anticuerpo fluorescente. El movimiento de las proteínas marcadas con GFP puede seguirse por lo tanto en células vivas.
11. La centrifugación de velocidad separa los orgánulos en base a su tamaño y forma, mientras que la centrifugación de equilibrio las separa en función de la densidad (independientemente de forma y tamaño).
12. El suero contiene factores de crecimiento que son necesarios para estimular la división de la mayoría de las células animales en cultivo.
13. Los cultivos celulares primarios son cultivos de células obtenidas directamente de un organismo o un tejido. Las líneas celulares inmortales poseen la capacidad de proliferar indefinidamente en cultivo.
14. Estas células retienen la capacidad de diferenciarse en todos los diferentes tipos celulares de los organismos adultos, de modo que ofrecen el potencial de usarse en terapias de trasplante para el tratamiento de una diversidad de países.

CAPÍTULO 2

1. El agua es una molécula polar cuyos hidrógenos y oxígeno pueden formar puentes de hidrógeno entre ellos (para hacer que el agua sea líquida a la mayoría de las temperaturas de la Tierra) y sirve como un buen disolvente para las moléculas orgánicas polares y para los iones inorgánicos. El agua también repele a las moléculas, o a sus partes apolares, y las obliga a asociarse entre ellas para formar estructuras importantes como la membrana celular y de los orgánulos.
2. *El glucógeno es un polímero de la glucosa conectado* principalmente por enlaces α(1→4) glucosídicos, y posee ocasionalmente enlaces α(1→6) que producen ramificaciones. La celulosa es un polímero rectilíneo, sin ramificaciones, de enlaces β(1→4) entre residuos de glucosa.
3. Las grasas se acumulan en gotas lipídicas en las células (especialmente adipocitos) y son una forma eficaz de almacenaje de energía. *Los fosfolípidos funcionan como* el principal componente de las membranas celulares.
4. Los nucleótidos funcionan como transportadores de energía química (p. ej., ATP) y como moléculas de señalización intracelular (p. ej., AMP cíclico).
5. No. La información de los ácidos nucleicos se transmite mediante la secuencia de sus bases. Si las bases fueran eliminadas, quedaría una cadena de azúcar fosfato lineal con poco contenido informativo.
6. Christian Anfinsen y sus colaboradores demostraron que la ribonucleasa desnaturalizada puede espontáneamente volver a plegarse en una enzima activa en ausencia de otros constituyentes celulares. Esto demostraba que la información necesaria para el plegamiento estaba contenida en la secuencia primaria de la ribonucleasa.

7. La cadena lateral de la cisteína contiene un grupo sulfhidrilo que puede formar enlaces covalentes disulfuro con otro residuo de cisteína, estabilizando la estructura de la superficie celular y las proteínas secretadas.
8. El colesterol puede incorporarse en las membranas, donde regula la fluidez de la membrana. Adicionalmente, el colesterol es empleado en la síntesis de hormonas esteroideas.
9. La estructura en α-hélice permite a los grupos CO y NH de los enlaces peptídicos formar enlaces de hidrógeno entre ellos, neutralizando así su carácter polar: los barriles-β también son capaces de atravesar las bicapas lipídicas.
10. d. La alanina es el único aminoácido de la lista con una cadena lateral hidrofóbica capaz de interaccionar con los ácidos grasos de las membranas lipídicas.
11. En la primera dimensión, las proteínas se separan en un gradiente de pH de acuerdo con su carga total. En la segunda dimensión, las proteínas se separan en base a su masa.
12. En un enfoque, un orgánulo es purificado mediante fraccionamiento subcelular, y las proteínas contenidas en él son identificadas mediante espectrofotometría de masas. Otro enfoque, que ha sido empleado en el análisis total de las proteínas de levaduras, es expresar un gran número de proteínas fusionadas con GFP. La localización subcelular de las proteínas de fusión puede determinarse a continuación mediante microscopia de fluorescencia.

CAPÍTULO 3

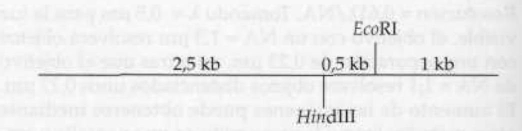
1. El aspartato es un aminoácido acídico que interacciona con los aminoácidos básicos en los sustratos de la tripsina. La sustitución de aspartato por lisina (un aminoácido básico) interferiría con la unión del sustrato y la catálisis.
2. La cadena lateral de la histidina puede carecer de carga o estar cargada positivamente en el pH fisiológico, permitiendo su uso para el intercambio de iones de hidrógeno.
3. La enzima E1 probablemente está regulada mediante retroalimentación negativa.
4. Una reacción energéticamente desfavorable puede acoplarse a una reacción energéticamente favorable con un incremento de energía libre negativa elevado (a menudo la hidrólisis de ATP), de modo que la reacción combinada es energéticamente favorable.
5. La reacción catalizada por la fosfofructoquinasa es fructosa-6-fosfato + ATP → fructosa-1,6-bifosfato + ADP. El incremento de energía libre estándar puede calcularse como la suma de las variaciones de energía libre estándar de la formación de fructosa-1,6-bifosfato a partir de fructosa-6-fosfato y fosfato ($\Delta G^{o\prime}$= +4 kcal/mol), y la variación estándar de la energía libre de la hidrólisis del ATP (–7,3 kcal/mol), dando una variación de energía libre de –3,3 kcal/mol para la reacción acoplada.
6. Al sustituir los valores dados en la ecuación:

$$\Delta G = \Delta G^{o} + RT \ln \frac{[B][C]}{[A]}$$

se obtiene el siguiente resultado: ΔG = –1,93 kcal/mol. Por lo tanto, la reacción procederá de izquierda a derecha, lo que significa que, en la célula, A se convertirá en B más C.
7. La fosfofructoquinasa es inhibida mediante concentraciones elevadas de ATP. Así, la glucólisis será inhibida en respuesta a un incremento de la concentración celular de ATP.
8. Bajo condiciones anaeróbicas, la glucosa es metabolizada sólo a través de la glucólisis, con una producción neta de 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Bajo condiciones aeróbicas, la glucosa se oxida completamente para producir 36 – 38 moléculas de ATP.
9. Bajo condiciones anaeróbicas el NADH producido durante la glucólisis es empleado para reducir el piruvato en etanol o lactato, generando así NAD^+.
10. Puesto que los lípidos están más reducidos que los ácidos grasos, su oxidación genera mucha más energía por molécula.
11. En las reacciones lumínicas, la energía derivada de la absorción de luz por las clorofilas se emplea para dividir el agua en $2H^+ + 1/2\ O_2 + 2e^-$. Los electrones entran en una cadena de transporte de electrones que resulta en la síntesis de ATP y NADPH. En las reacciones oscuras, el ATP y el NADPH dirigen la síntesis de glucosa a partir de CO_2 y H_2O.
12. Algunas reacciones de la glucólisis implican un gran descenso en energía libre y no son fácilmente reversibles. La gluconeogénesis evita estas reacciones mediante otras reacciones dirigidas por el gasto de ATP y NADPH.

CAPÍTULO 4

1. Criarías moscas con mutaciones en dos genes diferentes. Si las mutaciones de los dos genes se heredan juntas con frecuencia, los genes estarían asociados y residirían en los mismos cromosomas.
2. La mitad del ADN será de densidad intermedia y la mitad será ligero.
3. La adición o deleción de uno o dos nucleótidos alteraría el marco de lectura del gen, resultando en una secuencia de aminoácidos completamente diferente a la proteína codificada.
4. Para clonar este fragmento de ADN humano, un cromosoma artificial de levadura necesitaría telómeros y un centrómero para replicarse como una molécula semejante a un cromosoma lineal, además de un origen de replicación y una diana de corte para *Eco*RI.
5. UGC también codifica la cisteína, de modo que esta mutación no tendría ningún efecto sobre la función enzimática. UGA, sin embargo, es un codón de terminación, así que esta mutación generaría una proteína truncada que sería inactiva.
6. El mapa de restricción es:



7. El espermatozoide haploide contiene una única copia inicial de la secuencia de DNA. Cada ciclo de PCR amplifica por dos el material inicial, por lo que diez ciclos darían lugar a 2^{10}, aproximadamente mil copias. Al amplificarlo por 30 ciclos se generarían 2^{30}, o más de mil millones de copias.
8. De la Tabla 4.3, los cósmidos portan insertos de 30-45 kb. De la Tabla 4.2, la secuencia de reconocimiento de *Bam*HI tiene una longitud de 6 pb, que ocurre con una frecuencia aleatoria de una vez cada 4.000 pares de bases de ADN (4^6 = 4096). Dividiendo 30.000-45.000 entre 4.000, espera-

mos unos 10 fragmentos de *Bam*HI en un inserto de un cósmido.

9. El genoma humano es de aproximadamente 3×10^6 kb, y el tamaño de un inserto para un vector BAC es de 120-300 kb (Tabla 4.3). Dividiendo el tamaño del genoma entre el tamaño del inserto indica un mínimo de 10.000 a 25.000 clones de BAC serían necesarios para cubrir el genoma.
10. El virus de la gripe se replica mediante la síntesis de ARN dirigida por ARN, de modo que la actinomicina D (que inhibe la síntesis de ARN dirigida por ADN) no afecta a la replicación del virus de la gripe.
11. Un marcador seleccionable, como la resistencia a un principio activo, que te permite seleccionar las células establemente transfectadas.
12. Las proteínas son disueltas en una solución que contiene el detergente de carga negativa SDS. Cada proteína se une a muchas moléculas de SDS, que confiere una carga neta negativa a la proteína. A continuación, las proteínas pueden ser separadas mediante electroforesis en gel de acuerdo con su tamaño.

CAPÍTULO 5

1. Los organismos con genomas mayores que su complejidad poseen mayores cantidades de ADN no codificante.
2. Sharp y sus colaboradores construyeron híbridos entre hexones de ARN de adenovirus y ADN vírico de hebra sencilla. Tras su observación bajo un microscopio electrónico, observaron que el ARNm del hexón hibrida con regiones separadas del ADN vírico y el ADN intermedio no hibridado formaba lazos. Los lazos de ADN de hebra sencilla correspondían a los intrones que eran eliminados mediante corte y empalme del tránscrito primario.
3. Mediante procesamiento alternativo más de una proteína puede ser sintetizada a partir del mismo gen, incrementando así la diversidad de proteínas expresadas a partir de un número limitado de genes.
4. Debido a su diferente composición de bases, las repeticiones de secuencias sencillas (p. ej., ACAAACT) difieren en densidad de la relación AT/GC de la mayor parte del ADN nuclear. Las secuencias que contienen copias en tándem de estas repeticiones se separarán en una centrifugación en CsCl para formar bandas satélite que son diferentes de la banda principal de ADN genómico.
5. Un centrómero de *S. cerevisiae* es pequeño (125 pares de bases) y presumiblemente se une a un número limitado de proteínas cinetocóricas para formar un solo dominio de unión a microtúbulos. Los centrómeros de los cromosomas animales son mucho mayores, con secuencias repetidas que forman cinetócoros más extensos y proporcionan puntos de unión a múltiples microtúbulos.
6. Cortar el plásmido con un endonucleasa de restricción crea un cromosoma lineal con dos extremos libres, pero no telómeros. Los genes plasmídicos se pierden rápidamente debido a la inestabilidad de los extremos cromosómicos. Para comprobar esto, podrías unir las secuencias teloméricas a los extremos del plásmido linearizado y ver si esto permite que el plásmido se herede de forma estable.
7. La respuesta puede obtenerse dividiendo la longitud del genoma humano (3×10^6 kb) entre el número de genes, después de restar la longitud de ADN ocupada por los propios genes (calculada como el número de genes multiplicado por la longitud media de un gen [30 kb]). Así, la distancia media entre genes es de unos 100 kb.
8. Una molécula de histona H1 se une al ADN genómico aproximadamente cada 200 pb, de forma que el número de histonas H1 unidas al genoma de levaduras puede determinarse mediante la división del tamaño del genoma de levadura (12 Mb) entre 200 pb para generar un valor de 60.000.
9. De la Tabla 5.1, podemos calcular la longitud media del intrón humano dividiendo la longitud total de la secuencia intrónica entre el número de intrones en un gen humano medio: aproximadamente 3.400 pb.
10. De la Tabla 5.1, la secuencia exónica de un gen humano medio suma 2.500 pb. Esto sería la longitud media esperada de los insertos completos de ADNc en tu genoteca.
11. El Consorcio de Secuenciación del Genoma Humano secuenció clones BAC que ya habían sido mapeados a regiones concretas de los cromosomas humanos. Celera Genomics empleó una técnica de escopeta frente al genoma completo en el que fragmentos de ADN genómico eran secuenciados al azar y las secuencias solapantes entre fragmentos fueron empleadas para reagrupar y completar la secuencia completa.
12. A diferencia de las secuencias que codifican proteínas, las secuencias reguladoras son cortas, poco definidas y ocurren frecuentemente por azar en los genomas grandes, haciendo difícil la identificación de secuencias reguladoras funcionales. Las técnicas empleadas para identificar secuencias reguladoras funcionales incluyen buscar agrupaciones de elementos reguladores, secuencias evolutivamente conservadas, y secuencias presentes en genes regulados de forma coordinada.
13. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son diferencias en pares de bases aisladas entre los genomas de individuos. Estudiando los SNPs, podemos identificar genes asociados a susceptibilidad a distintas enfermedades

CAPÍTULO 6

1. A una temperatura elevada el mutante tendría defectos al reemplazar los cebadores de ARN con ADN en los fragmentos de Okazaki y en rellenar los espacios en el ADN que siguen a la reparación por escisión.
2. La topoisomerasa I corta una hebra del ADN en doble hélice y le permite girar en torno al otro enlace fosfodiéster para aliviar la tensión del giro. La topoisomerasa II corta a ambas hebras del ADN en doble hélice y puede pasar otra molécula de ADN a través del corte para separar las moléculas asociadas (p. ej., durante la mitosis).
3. De la Tabla 5.6, el tamaño del genoma de levadura es de 12 Mb (12 millones de pares de bases), mientras que los fragmentos de Okazaki poseen aproximadamente 1–3 kb (1.000–3.000 pares de bases) de longitud. Podemos calcular el número de fragmentos de Okazaki sintetizados durante la replicación mediante la división del tamaño del genoma entre la longitud de los fragmentos de Okazaki, dando un resultado de 4.000–12.000.
4. Las ADN polimerasas son incapaces de iniciar la síntesis de ADN *de novo*: sólo pueden añadir nucleótidos a una hebra cebadora preexistente. La primasa inicia *de novo* y sintetiza cebadores cortos de ARN, que pueden ser extendidos a continuación por una ADN polimerasa.
5. La actividad exonucleasa 3′ a 5′ es necesaria para la escisión de bases mal apareadas en ADN recién sintetizado. Un mutante de *E. coli* con una ADN polimerasa III que carece de esta actividad poseería una elevada frecuencia de mutaciones cada vez que se replique el ADN.

6. Insertarías la secuencia de ADN en plásmidos que carecen de un origen de replicación y determinarías si el plásmido recombinante es capaz de transformar levaduras mutantes que requieren un gen plasmídico para su crecimiento y división. Sólo los plásmidos con un origen funcional generarán una elevada frecuencia de colonias de levaduras transformadas.
7. Los ADN polimerasas son incapaces de replicarse en los extremos de moléculas lineales de ADN; las células de levaduras han evolucionado la telomerasa para mantener los extremos de sus cromosomas lineares. Puesto que el genoma de *E. coli* es una molécula de ADN circular y no posee extremos, no requiere mecanismos especiales para replicar los extremos del ADN linear.
8. Las roturas de doble hebra pueden repararse mediante la reparación recombinatoria. La recombinación con un cromosoma homólogo, como una cromátida hermana, puede permitir que la porción que falta de un cromosoma se copie desde una hebra sencilla del cromosoma homólogo. Las roturas de una sola hebra pueden ser reparadas mediante reparación por escisión, puesto que la hebra complementaria intacta está disponible para su uso como molde para dirigir la síntesis de la porción escindida de la hebra dañada.
9. La elevada frecuencia del cáncer de piel se debe a las lesiones en el ADN causadas por la radiación solar UV, las cuales se pueden reparar por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos. El que otros cánceres no tengan esta incidencia tan elevada sugiere que este tipo de lesión no es frecuente en los órganos internos, y que la mayoría de los cánceres se deben a otros tipos de mutaciones (p. ej., la incorporación de bases desapareadas durante la replicación del ADN).
10. Los procesos celulares que podrían estar afectados por estos principios activos incluyen el mantenimiento de los telómeros mediante la telomerasa y la transposición de retrotransposones.
11. En lugar de emplear la metilación de hebras parentales, el sistema de reparación de bases mal apareadas en humanos emplea las roturas de una sola hebra para identificar el ADN recién replicado. Así, un homólogo de *Mut H* no es necesario para las células humanas.
12. El ratón sería inmunodeficiente, careciendo tanto de linfocitos B como T, como resultado de ser incapaces de reorganizar sus genes de inmunoglobulinas y del receptor de células T.

CAPÍTULO 7

1. La secuencia de ADN está marcada radiactivamente en un extremo. A continuación es incubada con la proteína y sometida a una digestión parcial con ADNasa. El sitio al que se une la proteína estará protegido de la digestión, de forma que no aparecerán fragmentos de ese tamaño después de una electroforesis del ADN digerido.
2. Los factores sigma se unen a secuencias corriente arriba del punto de iniciación de la transcripción, trayendo a la ARN polimerasa específicamente a la región del promotor para iniciar la transcripción.
3. El tipo más común de terminación implica la transcripción de una repetición invertida rica en GC que forma una estructura de tallo-lazo mediante complementariedad de bases. La formación de esta estructura desorganiza la asociación del ARNm con el ADN y termina la transcripción.
4. La unión del represor con el operador influye en la unión de la ARN polimerasa al promotor, como consecuencia de lo cual se inhibe la transcripción.
5. El promotor que contiene la caja TATA puede transcribirse *in vitro* en presencia de TBP o TFIID. Sin embargo, el promotor Inr requiere TFIID, puesto que la secuencia Inr es reconocida por los TAFs en lugar de por TBP.
6. La actividad de los *enhancers* no depende ni de la distancia ni de su orientación con respecto al sitio de iniciación de la transcripción. Los promotores se definen como cercanos al sitio de iniciación de la transcripción.
7. El elemento de la secuencia sería un sitio de unión potencial para un represor específico de tejido.
8. Dividen cromosomas en dominios individuales de estructura cromatínica que puede ser eucromatina o heterocromatina, pero no puede extenderse más allá del aislante. Además, previenen que un *enhancer* en un dominio actúe sobre un promotor del dominio siguiente.
9. Uno de los dos cromosomas X es inactivado temprano en el desarrollo de la hembra (o en machos XXY). Un ARN denominado *Xist* es producido por el gen *Xist* en uno de los dos cromosomas X, y se une a la mayoría de los genes en ese cromosoma. El ARN *Xist* recluta proteínas que inducen la condensación cromatínica y la conversión de la mayoría del X inactivo en heterocromatina.
10. La unión específica de alta afinidad de Sp1 a la caja GC de la secuencia de ADN se explotó para su purificación bioquímica mediante cromatografía de afinidad de ADN. Para demostrar que la proteína purificada es Sp1, podrías llevar a cabo ensayos de transcripción *in vitro*.
11. El antisuero anti-Sm se uniría a las RNPsn y prevendría su unión a los sitios de procesamiento, inhibiendo así el corte y empalme.
12. Los ARN no codificantes pueden reprimir la transcripción de un gen diana mediante el complejo RITS y pueden inducir la degradación de un ARNm diana mediante el complejo RISC. Así, los ARNs no codificantes pueden regular tanto la síntesis como la degradación de los tránscritos diana.
13. Los factores de procesamiento dirigen a los RNPsn a las dianas correctas de corte y empalme mediante su unión a secuencias específicas del pre-ARNm.
14. Apo-B100 es sintetizado en el hígado mediante la traducción de un ARNm no editado. La Apo-B48 más corta es sintetizada en el intestino mediante la traducción de un ARNm editado en el que la reacción de edición ha generado un codón de terminación.
15. La degradación del ARNm sin sentido es un proceso de control de calidad por el que los ARNm que carecen de marcos de lectura completos son degradados. Este proceso elimina los ARNm defectuosos que darían lugar a proteínas anómalas truncadas.

CAPÍTULO 8

1. Muchos ARNt son capaces de formar enlaces de hidrógeno con más de un codón porque la tercera base de su anticodón puede «temblar» o aparearse de formas no estándar con numerosos nucleótidos distintos de sus pares complementarios habituales.
2. Se necesita una secuencia Shine-Delgarno.
3. Los ribosomas deplecionados de la mayoría de sus proteínas todavía pueden sintetizar polipéptidos, mientras que el tratamiento con ARNasa acaba por completo con la actividad traduccional. Adicionalmente, el análisis es-

tructural de alta resolución de la subunidad ribosómica 50S mostró que el sitio en el que tiene lugar la reacción de peptidil transferasa está compuesto por ARNr, no proteínas ribosómicas.

4. La poliadenilación es un mecanismo importante de regulación de la traducción en el desarrollo temprano. Su inhibición bloquearía la traducción de muchos ARNms de oocitos tras la fecundación.
5. Las chaperonas son proteínas que ayudan al correcto plegamiento de otras proteínas. Las temperaturas elevadas pueden desnaturalizar las proteínas. Las proteínas de choque térmico son chaperonas que facilitan el replegamiento de estas proteínas desnaturalizadas, restaurando así la correcta función proteica.
6. El tratamiento con fosfolipasa liberaría de la superficie celular una proteína unida a GPI, pero no una proteína transmembrana.
7. La degradación de la ciclina B, que permite a las células salir de la mitosis, requiere una secuencia específica de 9 aminoácidos denominada caja de destrucción. Las mutaciones de esta secuencia previenen la ubiquitinación y la degradación de la ciclina B y bloquean la salida de la mitosis.
8. No. Además de dirigir proteínas hacia su degradación, la ubiquitinación de una proteína puede poseer otras funciones, incluyendo dirigir proteínas para una modificación de histonas que regula la transcripción
9. Los miARN pueden dirigir ARNm específicos mediante el complejo RISC, desencadenando la degradación del ARNm o la inhibición de la traducción.
10. Las secuencias de los UTRs 3′ pueden regular la estabilidad, localización y traducción funcionando como sitios de unión para factores de regulación de los miARN.
11. Puesto que *T. aquaticus* crece a altas temperaturas, su ARNr es más estable que el ARNr de *E. coli* y más capaz de soportar los procedimientos vigorosos de extracción proteica empleados en los experimentos de Noller.
12. Las señales secuencia que dirigen las proteínas hacia compartimentos celulares específicos a menudo son retiradas mediante la acción de las peptidasas señal. Adicionalmente, muchas proteínas son sintetizadas como proteínas precursoras mayores y son procesadas proteolíticamente para generar proteínas maduras.
13. Un «centro de decodificación» en la subunidad menor del ribosoma reconoce los pares de bases codón-anticodón correctos y discrimina frente a apareamientos erróneos. La inserción de un aminoacil ARNt correcto en el sitio A induce un cambio conformacional que causa la hidrólisis del GTP unido a eEF-1α y la liberación del factor de elongación unido a GDP.
14. El PDI cataliza la formación de puentes disulfuro. La inhibición del PDI por el ARNsi interferirá en el plegamiento correcto de la ARNasa, por lo que detectarás una actividad ARNasa mucho menor en el cultivo de células que expresan ARNsi.

CAPÍTULO 9

1. Los ARNm procarióticos son traducidos a medida que se transcriben. La separación del sitio de transcripción del sitio de traducción en eucariotas permite la regulación de los ARNm mediante procesos postraduccionales, como el corte y empalme alternativo, la poliadenilación, y el transporte regulado del citoplasma. Adicionalmente, la transcripción puede ser regulada mediante la modulación de la localización nuclear de los factores de transcripción.
2. Las lamininas de la red filamentosa que soporta y estabiliza la envuelta nuclear. Las lamininas también proporcionan sitios de unión para que la cromatina se una al interior de la envuelta nuclear. Además, muchas de las proteínas que participan en la transcripción, la replicación del ADN y la modificación de la cromatina, interaccionan con las lamininas.
3. La proteína de 15 kd, pero no la de 100 kd, será capaz de entrar en el núcleo, puesto que las proteínas inferiores a aproximadamente 20 kd pueden difundir libremente a través del complejo del poro nuclear.
4. La distribución de Ran/GTP a través de la envuelta nuclear determina la dirección del transporte nuclear.
5. Un ejemplo es NF-κB. En células no estimuladas, el IκB se une al NF-κB, y el complejo no puede ser importado al núcleo. Tras la estimulación, el IκB es fosforilado y degradado mediante proteólisis mediada por ubiquitina. Esto expone la señal de localización nuclear de NF-κB, permitiéndole entrar y activar la transcripción de los genes diana.
6. El factor de transcripción ya no podría ser fosforilado en estas dianas, de modo que sería importado constitutivamente al núcleo para activar la expresión de los genes diana.
7. La inactivación de la señal de exportación nuclear resultaría en la retención de la proteína en el núcleo.
8. Podrías marcar el ADN recién sintetizado con bomodesoxiuridina, que se incorpora en el ADN en lugar de la timina. El ADN marcado con bromodesoxiuridina puede localizarse mediante anticuerpos contra el bromodesoxiuridina y el uso de microscopia de fluorescencia.
9. Kalderon y sus colaboradores fusionan la secuencia aminoacídica 126 a 132 del antígeno T a las proteínas normalmente citoplásmicas, β-galactosidasa y piruvato quinasa. Estas proteínas de fusión se acumulan en el núcleo.
10. Las motas nucleares contienen poblaciones concentradas de RNPpn y se cree que son sitios de almacenamiento de componentes del corte y empalme.
11. Los ARN pequeños y nucleolares (ARNpno) se localizan en el nucléolo donde participan en la escisión y modificación de los ARNr.
12. La exportina-t es necesaria para el exporte de ARNt desde el núcleo, de modo que inhibiendo la función de la exportina-t prevendría la exportación del ARNt y desencadenaría la inhibición de la traducción.

CAPÍTULO 10

1. Palade y sus colaboradores trataron a las células acinares pancreáticas con un pulso de aminoácidos radioactivos, que se incorporan en las proteínas. La autorradiografía mostró que las proteínas marcadas se detectaron en primer lugar en el RE rugoso. Tras una corta «persecución» de aminoácidos no radiactivos, las proteínas marcadas se movieron al aparato de Golgi, y tras períodos más largos, las proteínas marcadas se encontraron en las vesículas secretoras y después en el exterior de las células.
2. Cuando un ARNm que codifica para una proteína secretada es traducido *in vitro* sobre ribosomas libres, resulta una proteína mayor que la obtenida cuando el mismo ARNm es traducido en presencia de microsomas del RE rugoso. En el último caso, la secuencia señal es escindida por una peptidasa señal en las vesículas del RE rugoso.

3. La translocación cotraduccional implica la unión a la partícula de reconocimiento de la señal y la translocación a través del translocón dirigido por el proceso de síntesis en los ribosomas. La translocación postraduccional dirige a un polipéptido al RE tras la finalización de la síntesis y no requiere una SRP. Un complejo Sec 62/63 reconoce a un polipéptido que debe ser incorporado, y lo inserta en un translocón. El polipéptido es arrastrado al lumen del RE por una chaperona denominada «BiP».
4. Las proteínas unidas al aparato de Golgi son incapaces de penetrar en el RE en un mutante Sec61 y por lo tanto permanecen en el citosol.
5. Los grupos hidrocarbonados se añaden en el lumen del ER y del aparato de Golgi, que son topológicamente equivalentes al exterior de la célula.
6. La mutación de la secuencia KDEL inhibiría el retorno de la proteína residente en el RE desde el Golgi al RE, de modo que sería secretado al exterior celular. La inactivación de la proteína receptora de KDEL resultaría en la secreción de todas las proteínas del RE que contienen la secuencia KDEL.
7. Inicialmente, una secuencia señal dirige al polipéptido lisosómico naciente o a la proteína prelisosómica al RER, entonces se le añade un oligosacárido mediante un enlace *N*. Después de trasladarse al Golgi, se mantienen tres residuos de manosa que normalmente se eliminan, y se convierten en manosa-6-fosfato en un proceso en dos pasos (que tiene lugar en el *cis* Golgi). Estos residuos de manosa-6-fosfato son reconocidos y unidos por un receptor en la red del *trans* Golgi, que dirige su transporte a los lisosomas.

   La proteína normalmente citosólica carece de una secuencia señal y por lo tanto no entra en el RE. Por lo tanto, la adición de una señal de localización lisosómica no tendría ningún efecto. Por el contrario, dicha adición dirigiría una proteína normalmente secretada hacia los lisosomas desde el aparato de Golgi.
8. En ausencia de la síntesis de manosa-6-fosfato en el aparato de Golgi, las proteínas lisosomales normales serían secretadas.
9. Los glicolípidos y la esfingomielina son producidos por la adición de azúcares o fosforilcolina a la ceramida en las superficies citosólica y lumínica, respectivamente, del aparato de Golgi. La glucosilceramida es a continuación traspasada a la superficie lumínica. Después del transporte vesicular y fusión con la membrana plasmática, estos lípidos se localizan en la mitad externa de la membrana plasmática.
10. El diagnóstico de la enfermedad de Gaucher. Puesto que la patología implica una mutación en la hidrolasa glucocerebrosidasa lisosómica, podrías sugerir la terapia de sustitución enzimática.
11. Las enzimas destinadas para los lisosomas son hidrolasas ácidas y no son activas a los pH neutrales del citoplasma, el RE, o el aparato de Golgi. Las hidrolasas ácidas son activadas por el pH ácido de los lisosomas, que se mantiene mediante bombas de protones lisosómicas.
12. La fuerte interacción entre los dominios superenrolados de los v-SNARE y t-SNARE sitúa a las dos membranas casi en contacto directo. Esto produce inestabilidad en la membrana y da lugar a que las membranas se fusionen.
13. Las proteínas Rab se almacenan en su forma unida a GDP en el citosol mediante asociación con inhibidores de la disociación GDP (GDI). En las membranas, los GDI son eliminados mediante factores de desplazamiento de GDI y los factores de intercambio de nucleótidos de guanina localizados en la membrana estimulan el intercambio de GTP por GDP.

CAPÍTULO 11

1. El área de superficie de la membrana mitocondrial interna es elevado debido a la formación de crestas. Además, el contenido proteico de la membrana es especialmente elevado (>70%), e incluye numerosas enzimas y transportadores de electrones.
2. Los ARNt mitocondriales son capaces de hacer una forma extrema de tiemblo en el que el anticodón U puede aparearse con cualquiera de las cuatro bases en la tercera posición del ARNm, permitiendo que cuatro codones sean reconocidos por un solo ARNt.
3. El gradiente de protones de 1 unidad de pH corresponde a una $[H^+]_o$ diez veces superior. Sustituyendo este valor en la ecuación:

   $$\Delta G = RT \ln[H^+]_i/[H^+]_o$$

   Se obtiene una respuesta de aproximadamente −1,4 kcal/mol.
4. Las proteínas Hsp70 en el citosol mantienen proteínas mitocondriales recién sintetizadas en un estado sin plegar para que puedan ser insertadas en el complejo Tom y ser importadas como una cadena sin plegar. Las chaperonas de la matriz mitocondrial Hsp70 se unen a la cadena polipeptídica a medida que emerge del complejo Tim y emplean la hidrólisis de ATP para arrastrar el polipéptido hacia la matriz. En algunos casos, el complejo de la chaperonina Hsp60 se une al polipéptido y facilita su plegamiento en su estructura terciaria apropiada.
5. La primera señal de internalización cargada positivamente desencadena la internalización en la matriz mitocondrial, donde esta presecuencia es retirada, y la segunda secuencia hidrofóbica dirige al polipéptido a Oxa1, una translocasa de la membrana mitocondrial interna que introduce el citocromo *b2* en el espacio intermembrana.
6. La coenzima Q acepta un par de electrones del complejo I o del complejo II y los pasa al complejo III. La coenzima Q también une dos protones de la matriz mitocondrial, los transporta a través de la membrana interna y los libera en el espacio intermembrana, contribuyendo a la generación de un gradiente de protones. El citocromo *c* es una proteína pequeña que se encuentra en el espacio intermembrana que toma un par de electrones del complejo III y los transfiere al complejo IV.
7. F_0 se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias y en la membrana del tilacoide de los cloroplastos. F_1 es el tallo y el engrosamiento que se extiende desde F_0 hacia la matriz mitocondrial y hacia el estroma de los cloroplastos. El complejo F_0 proporciona un canal a través del cual los protones pueden volver a la matriz o al estroma. El acoplamiento mecánico del tallo dirige la rotación en el interior del complejo F_1 que causa la síntesis de ATP.
8. Al contrario que las mitocondrias, no existe potencial eléctrico a través de la membrana del cloroplasto. Así que la carga de los péptidos de tránsito no contribuye a la translocación de la proteína.

9. Se requieren dos electrones activados para romper cada molécula de agua, por lo que son necesarios 24 electrones activados para la síntesis de cada molécula de glucosa. El paso de estos electrones a través de los dos fotosistemas genera 12 moléculas de NADPH y entre 12 y 18 moléculas de ATP, dependiendo de la estequiometría del bombeado de protones en el complejo citocromo *bf*. Puesto que se requieren 18 moléculas de ATP para el ciclo de Calvin, la síntesis de glucosa puede necesitar ATPs adicionales producidos por el flujo cíclico de electrones.
10. Tres de cada cuatro átomos de carbono convertidos en glicolato son devueltos a los cloroplastos y vuelven a entrar en el ciclo de Calvin.
11. Las proteínas peroxisómicas se sintetizan sobre ribosomas libres en el citosol y se dirigen a los peroxisomas mediante una secuencia de señal Ser-Lys-Leu en su extremo carboxilo terminal, o una secuencia de nueve aminoácidos en el extremo amino terminal. Estas secuencias son reconocidas por receptores e internalizadas a través de transportadores en la membrana sencilla del peroxisoma.
12. Mientras que la membrana del tilacoide es impermeable a los protones, es libremente permeable para otros iones, que pueden neutralizar el componente de voltaje de su gradiente de protones.

CAPÍTULO 12

1. Los monómeros de actina asimétricos se asocian de forma cabeza-cola para formar los filamentos de actina. Puesto que todos los monómeros se orientan en la misma dirección, el filamento tiene una clara polaridad. La polaridad de los filamentos de actina define la dirección del movimiento de la miosina. Si los filamentos de actina no fuesen polares, el movimiento unidireccional de la miosina que resulta del deslizamiento de los filamentos de actina y miosina no tendría lugar.
2. El *treadmilling* es un comportamiento dinámico de los filamentos de actina (o microtúbulos) en el que mantienen su longitud prácticamente constante mediante la adición de ATP-actinas (o GTP-tubulinas) al extremo protuberante (o positivo), y la disociación un número equivalente de ADP-actinas (o tubulinas) del extremo puntiagudo (o negativo). Durante este comportamiento de ritmo constante, las subunidades hidrolizan sus nucleósidos trifosfato después del ensamblaje, fluyen a través del filamento y salen del extremo puntiagudo (o negativo). El *treadmilling* tiene lugar a concentraciones de monómero comprendidas entre la concentración crítica para el extremo protuberante (o positivo) y la concentración crítica para el extremo puntiagudo (o negativo).
3. La citocalasina se une al extremo positivo de los filamentos de actina y bloquea su elongación, de modo que daría lugar a la despolimeración de los fragmentos *treadmilling*. La faloidina se une a los filamentos de actina e inhibe su despolimerización, de modo que causaría que los filamentos detuviesen el *treadmilling*, pero permanecerían presentes y se harían más largos.
4. La ADF/cofilina se une a los filamentos de actina e incrementa la disociación de los monómeros de actina. La profilina une actina/ADP y estimula el intercambio de ADP por ATP, formando monómeros de actina/ATP que pueden unirse a los filamentos crecientes. El complejo Arp2/3 inicia la formación de ramificaciones.
5. La banda I y la zona H se acortan durante la contracción. La banda A no se acorta porque está ocupada por filamentos de miosina gruesos.
6. La contracción de las células de músculo liso está regulada por la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina por parte de la quinasa de la cadena ligera de miosina, que a su vez está regulada por la asociación de la proteína de unión a calcio calmodulina. Un incremento en la concentración citosólica de calcio da lugar a la unión de calmodulina a la quinasa de la cadena ligera de miosina.
7. Los filamentos intermedios no son necesarios para el crecimiento celular en cultivo, de modo que el ARNsi contra vimentina no tendría efecto.
8. Los dímeros de los filamentos intermedios citoesqueléticos se ensamblan de forma escalonada y antiparalela para formar tetrámeros, que pueden ensamblarse a continuación de extremo a extremo para formar protofilamentos. Puesto que se ensamblan a partir de tetrámeros antiparalelos, los filamentos intermedios no poseen extremos diferentes y son apolares.
9. El movimiento *in vitro* de los microtúbulos requería ATP y era inhibido mediante el análogo de ATP no hidrolizable AMP-PNP. Así, los orgánulos permanecieron unidos a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP, sugiriendo que las proteínas motoras responsables del movimiento de orgánulos también podrían estar unidas.
10. Mediante la unión de dobletes de microtúbulos presentes en los cilios, la nexina convierte el desplazamiento de los microtúbulos individuales en un movimiento de flexión que desencadena el batido de los cilios. Si fuese eliminado, los microtúbulos simplemente se desplazarían entre sí.
11. La colcemida inhibe la polimerización de microtúbulos e inhibiría el transporte de las vesículas secretoras sobre los microtúbulos.
12. La γ-tubulina juega un papel clave en la formación de centros organizadores de microtúbulos. La γ–tubulina se asocia con otras proteínas para formar el complejo del anillo de γ-tubulina, que funciona como semilla para la nucleación de nuevos microtúbulos.

CAPÍTULO 13

1. A temperaturas elevadas, la estructura anular del colesterol inhibe el movimiento de los fosfolípidos en la bicapa, reduciendo así la fluidez de la membrana y aumentando la estabilidad. A bajas temperaturas, la estructura del colesterol interfiere con las interacciones de la cadena de los ácidos grasos y mantiene la fluidez de la membrana.
2. Las proteínas periféricas de membrana pueden retirarse de la membrana mediante un lavado fuerte en sales o mediante soluciones con un pH extremo que afectan a la bicapa fosfolipídica. Las proteínas integrales de membrana sólo pueden extraerse de las membranas mediante detergentes que desorganizan la bicapa de fosfolípidos.
3. Frye y Edidin fusionaron células de ratón y células humanas y examinaron la distribución de las proteínas de membrana después de marcarlas con anticuerpos anti-ratón y anti-humano conjugados con sondas fluorescentes. Inmediatamente después de la fusión, las proteínas se localizaban en mitades diferentes de la superficie celular fusionada, pero después de una breve incubación a 37 °C las proteínas se entremezclaban. Esto demostraba que las proteínas podían difundir lateralmente en una membra-

na fluida. Si se incubaban a 2 °C, las proteínas permanecían separadas porque la membrana no es fluida a esta temperatura.

4. Las balsas lipídicas son dominios definidos de la membrana que están enriquecidos en colesterol y esfingolípidos. Se cree que las balsas lipídicas juegan papeles importantes en el movimiento celular, la endocitosis y la señalización celular.
5. El glicocáliz protege la superficie celular y está implicado en las interacciones célula-célula.
6. Dado que $C_0/C_i = 10$, el potencial de equilibrio de K^+ calculado a partir de la ecuación de Nernst es de aproximadamente –59mV. El potencial de membrana basal difiere del de potencial de equilibrio del K^+ porque los axones de calamar en estado basal son más permeables al K^+ que a otros iones.
7. La apertura de los receptores nicotínicos de acetilcolina es necesaria para la despolarización de la membrana en las células musculares. Así, el curare bloquea la contracción de las células musculares en respuesta a la acetilcolina.
8. El canal de K^+ contiene un filtro selectivo revestido por átomos de carbonil oxígeno. El poro tiene una apertura que justo permite el paso de iones K^+ deshidratados de los que todas las moléculas de agua han sido desplazadas como resultado de la asociación con los átomos de carbonil oxígeno. Los iones de Na^+ hidratados son demasiado pequeños para interaccionar con los átomos de carbonil oxígeno y permanecen asociados con las moléculas de agua. Este complejo es demasiado grande para pasar por el poro del canal.
9. La ingesta de glucosa en contra de su gradiente de concentración está acoplada al transporte de iones Na^+ en la dirección energéticamente favorable.
10. El gen *mdr* codifica para el transportador ABC que frecuentemente está sobreexpresado en células cancerosas. El transportador puede reconocer una diversidad de principios activos y bombearlos al exterior celular, confiriéndole resistencia a los medicamentos quimioterapéuticos.
11. La adición de un exceso de LDL no marcado redujo la unión del LDL marcado a la superficie de las células normales. Esto indicaba que el LDL marcado y no marcado, competían por un número limitado de sitios de unión en la superficie de células normales.
12. Dos tipos de mutaciones en el receptor de LDL resultando en la incapacidad de ingerir LDL fueron identificados en los pacientes de FH. Las células de la mayoría de los pacientes con FH no unían LDL, demostrando que un receptor específico era necesario para la ingesta. Otros receptores mutantes unían LDL, pero no se acumulaban en las invaginaciones, demostrando el papel de las invaginaciones revestidas en la endocitosis mediada por receptores.

CAPÍTULO 14

1. Las bacterias grampositivas poseen una sola membrana —la membrana plasmática— rodeada por una gruesa pared celular. Las bacterias gramnegativas tienen tanto una membrana plasmática y una membrana externa, separadas por una fina pared celular.
2. La pared celular vegetal rígida previene el hinchamiento de las células y permite la acumulación de la presión de turgencia.
3. Las hemicelulosas son polisacáridos ramificados que se unen mediante enlaces de hidrógeno a la superficie de las microfibrillas de celulosa. Esta interacción estabiliza las microfibrillas de celulosa en fibras resistentes.
4. La localización correcta de estos transportadores de glucosa es necesaria para la función polarizada de las células epiteliales intestinales en la transferencia de glucosa desde el lumen intestinal hacia el torrente sanguíneo. Las uniones estrechas impiden la difusión de estos transportadores entre dominios de la membrana plasmática, además de sellar los espacios entre células del epitelio.
5. La hidroxilisina estabiliza la triple hélice de colágeno mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas polipeptídicas. La inhibición de la lisil hidroxilasa disminuiría, por lo tanto, la estabilidad de las fibrillas de colágeno.
6. Los colágenos formadores de fibrillas son sintetizados como precursores solubles conocidos como procolágenos. Los procolágenos poseen segmentos no helicoidales en sus extremos, que previenen el ensamblaje de fibrillas. Sólo después de que el procolágeno sea secretado al exterior celular, los segmentos no helicoidales son eliminados y las fibrillas son ensambladas.
7. Los GAG contienen residuos de azúcares acídicos, que son modificados mediante la adición de grupos sulfatos. Esto imparte una elevada carga negativa a los GAG, de modo que pueden unirse a iones de carga positiva y atrapar moléculas de agua de los geles hidratados.
8. El péptido probablemente desorganiza las uniones estrechas, permitiendo así la libre difusión del transportador entre los dominios apicales y basolaterales de la membrana plasmática.
9. Puesto que las cadherinas E median la adhesión selectiva de las células epiteliales, la sobreexpresión de una versión dominante negativa desorganizaría las interacciones entre células vecinas.
10. El dominio citoplásmico de la integrina $\alpha_6\beta_4$ es necesario para su interacción con el citoesqueleto de filamentos intermedios a través de la plectina. La mutación, por lo tanto, desorganizaría la formación del hemidesmosoma y desencadenaría un descenso de la interacción célula-matriz.
11. Las sinapsis eléctricas están especializadas en las uniones *gap* que se encuentran en las células nerviosas. Permiten el paso rápido de iones entre células, conduciendo así el impulso nervioso.
12. Las uniones *gap* y los plasmodesmas son similares en que ambos proporcionan canales entre los citoplasmas de células adyacentes. Probablemente sean análogos en lugar de estructuras homólogas entre animales y plantas, puesto que sus estructuras son extremadamente distintas.

CAPÍTULO 15

1. En la señalización paracrina, las moléculas liberadas por una o unas pocas células afectan a las células cercanas. En la señalización endocrina, las hormonas son transportadas por el cuerpo para actuar sobre una célula diana que tiene un receptor para esa hormona.
2. Las moléculas hidrofóbicas como las hormonas esteroideas pueden difundir a través de la membrana plasmática y se unen a receptores citosólicos o nucleares. Las moléculas hidrofílicas (como las hormonas peptídicas) no pueden cruzar la membrana plasmática, de modo que ac-

túan uniéndose a receptores presentes en la superficie celular.

3. La aspirina inhibe a la enzima ciclooxigenasa, que cataliza el primer paso de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico.
4. La inhibición de la AMPc fosfodiesterasa dará lugar a un nivel elevado de AMPc, que estimulará la proliferación celular.
5. La molécula recombinante funcionaría como un receptor de epinefrina acoplado a G_i. La epinefrina, por tanto, inhibiría la adenilil ciclasa, disminuyendo los niveles de AMPc intracelulares. La acetilcolina no tendría efecto, puesto que no uniría al receptor recombinante.
6. Los monómeros de PDGF no inducirán la dimerización del receptor. Puesto que esto es el primer paso en la señalización de las proteína-tirosina quinasas receptoras, los monómeros no serán capaces de activar el receptor de PDGF.
7. El receptor truncado actuaría como un mutante dominante negativo porque dimerizaría con el receptor normal. Los dímeros serían inactivos porque serían incapaces de llevar a cabo la fosforilación cruzada.
8. La proteína fosfatasa 1 defosforila residuos de serina que son fosforilados por la proteína quinasa A. Los genes inducibles por AMP cíclico son activados por CREB, que es fosforilado por la proteína quinasa A, de modo que la sobreexpresión de proteína fosfatasa 1, inhibiría su inducción. Sin embargo, la proteína fosfatasa 1 no afectaría a la actividad de canales controlados por la unión de AMP cíclico, puesto que estos canales son abiertos directamente mediante la unión de AMPc en lugar de mediante fosforilación proteica.
9. Akt fosforila la proteína quinasa GSK-3 que regula la traducción del factor eIF2B. Además, Akt regula la proteina quinasa mTOR/raptor, que regula la traducción mediante la fosforilación de la S6 quinasa y la proteína de unión a eIF4E, 4E-BP1.
10. Sos es necesario para la activación de Ras, de modo que ARNsi frente a Sos inhibiría la inducción del gen temprano inmediato.
11. Las JAK fosforilan y activan las STAT en respuesta a la señalización por citoquinas. La expresión de un dominante negativo de JAK inhibiría la activación de STAT y bloquearía la inducción génica.
12. La mutación probablemente altera el sitio de ubiquitinación de la β-catenina, desencadenando su estabilización y acumulación nuclear. En el núcleo la β-catenina forma un complejo con los factores de transcripción Tcf e induce la expresión génica.

CAPÍTULO 16

1. Las células en G_0 y G_1 poseen la misma cantidad de ADN ($2n$) y ambas son metabólicamente activas. Las células en G_0 difieren de las células en G_1 en que permanecen en un estado inactivo y no proliferan a no ser que sean estimuladas para retomar el ciclo celular.
2. El porcentaje de células en un estadio específico del ciclo celular puede emplearse para calcular la duración de esa fase. Puesto que la célula tarda 30 horas en completar todas las fases y el 53,3% de todas las células tienen un contenido de ADN de $2n$ (células G_1), la duración de G_1 es de 16 horas (53,3% de 30 horas). Las células en la fase S tienen contenidos de ADN de entre $2n$ y $4n$: estos corresponden al 30% de las células, de modo que la duración de S es de 9 horas. El 16,7% de las células tienen un contenido de ADN de $4n$, correspondiente a células en las fases G_2 y M. Puesto que el 3,3% de las células se encuentran en fase M, el 13,4% están en G_2. La duración de G_2 es por lo tanto de 4 horas, y la de M es 1 hora.
3. La detención del ciclo celular en los puntos de control G_1 y S permite tiempo para que el ADN dañado sea reparado antes de ser replicado. La detención en el punto de control de G_2 permite tiempo para que las roturas de ADN u otros daños sean reparados antes de que se produzca la mitosis, impidiendo que el ADN dañado pase a las células hijas.
4. Las Cdk están reguladas por cuatro mecanismos diferentes: la asociación con las ciclinas, la activación por fosforilación, las fosforilaciones inhibitorias, y la asociación con los inhibidores de Cdk.
5. Una célula hija recibiría dos copias del cromosoma mal alineado, la otra célula hija no recibiría ninguna.
6. El complejo Cdk7/ciclina H es una quinasa activadora de Cdk que también es necesaria para la iniciación de la transcripción por ARN polimerasa II. Así, la inhibición de Cdk7 desencadenaría la detención del ciclo celular y la inhibición de la transcripción.
7. En una célula normal, la sobreexpresión de p16 inhibiría la progresión del ciclo celular en el punto de restricción de G_1. Puesto que Rb es la principal diana de los complejos Cdk4, 6/ciclina D, una célula tumoral que carezca de un Rb funcional no se vería afectada por la sobreexpresión de p16.
8. La fosforilación de las lamininas nucleares es necesaria para la degradación de la lámina nuclear. La expresión de lamininas mutantes carecientes de un sitio de fosforilación por Cdk1 prevendría la degradación de la envuelta nuclear.
9. Cdk1/ciclina B fosforila varias proteínas estructurales directamente para alterar sus propiedades e iniciar la mitosis. Entre ellas se encuentran las condensinas, las lamininas nucleares, las proteínas de la matriz del Golgi, y las proteínas asociadas a los microtúbulos. Adicionalmente, Cdk1/ciclina B activa otras proteínas quinasas.
10. La anafase se iniciaría de forma normal. Sin embargo, Cdk1/ciclina B permanecería activo, de modo que la reformación de los núcleos, la descondensación cromosómica y la citocinesis no tendría lugar.
11. El complejo promotor de la anafase degrada la securina, desencadenando la activación de la proteasa separasa. La separasa a continuación degrada las cohesinas, rompiendo la unión entre las cromátidas hermanas.
12. Los oocitos de estos ratones no se detendrían en la metafase II.
13. La unión del primer espermatozoide a su receptor libera calcio en el interior del óvulo, probablemente como resultado de la escisión de PIP_2 para liberar IP_3, lo que abre los canales de Ca^{2+} dependientes de IP_3 en el RE. Este calcio induce la exocitosis de los gránulos secretores cuyo contenido altera la envuelta extracelular del óvulo para bloquear la entrada de más espermatozoides.

CAPÍTULO 17

1. Las células apoptóticas son eliminadas eficientemente de los tejidos mediante fagocitosis, mientras que las células que mueren por lesiones agudas liberan su contenido al espacio extracelular y causan inflamación.

2. Las caspasas son sintetizadas como precursores inactivos largos que se activan en complejos (p. ej., el apoptosoma) o convertidos en enzimas activas mediante escisión proteolítica. Adicionalmente, las células contienen IAP que se asocian con las caspasas para inhibir su actividad.
3. La escisión de las lamininas por parte de las caspasas es necesaria para la fragmentación nuclear durante la apoptosis. Las lamininas mutadas no serán escindidas por las caspasas, y su expresión bloqueará la fragmentación nuclear.
4. Los miembros proapoptóticos multidominio de la familia Bcl-2 inducen apoptosis estimulando la liberación del citocromo *c* desde las mitocondrias, lo que desencadena la activación de las caspasas. La actividad de las proteínas proapoptóticas multidominio está regulada por los miembros antiapoptóticos y solo-BH3 de la familia Bcl-2.
5. La activación de p53 en respuesta al ADN lesionado desencadena la expresión de sus genes diana, que incluyen el inhibidor de Cdk p21 y los miembros solo-BH3 de la familia Bcl-2 PUMA y Noxa. p21 induce la detención del ciclo celular y los miembros solo-BH3 de la familia Bcl-2 inducen la apoptosis.
6. El Bad mutante no se mantendría en el estado activo por acción de la proteína 14-3-3, de modo que actuará induciendo la apoptosis.
7. Las proteínas 14-3-3 secuestran proteínas proapoptóticas, como los factores de transcripción Bad y FOXO, en un estado inactivo. Las células que expresan ARNsi contra proteínas 14-3-3, tendrán por lo tanto una tasa incrementada de apoptosis.
8. La caspasa-8 es la caspasa iniciadora por debajo de los receptores de TNF, de modo que las células con la caspasa-8 inactiva no sufrirán apoptosis tras el tratamiento con TNF. Así, la terapia con TNF no sería efectiva para este paciente.
9. Ced-3 es la única caspasa de *C. elegans*. Su mutación desencadena la supervivencia de todas las células que normalmente morirían por apoptosis durante el desarrollo, y el ARNi contra Ced-3 tendría el mismo efecto.
10. El polipéptido provocará la liberación del citocromo *c* por las mitocondrias e inducirá la apoptosis de las células tratadas.
11. Los tejidos contienen células madre y retienen la capacidad de proliferar y reemplazar las células diferenciadas.
12. La característica crítica de las células madre es su capacidad de autorrenovación. Se dividen para producir una célula hija que sigue siendo una célula madre y una célula hija que se divide y se diferencia.
13. Las células madre embrionarias son más fáciles de aislar y cultivar y son capaces de generar todos los tipos celulares diferenciados presentes en un organismo adulto.

CAPÍTULO 18

1. Los tumores benignos permanecen confinados en su localización original, mientras que los tumores malignos pueden invadir los tejidos normales de alrededor y metastatizar a otras partes del cuerpo.
2. A medida que un tumor progresa, las mutaciones ocurren en las células que forman parte de la población tumoral. Algunas de estas mutaciones confieren una ventaja selectiva a las células en las que ocurren, y les permiten crecer más que las otras células del tumor. Este proceso se denomina selección clonal, y desencadena el desarrollo continuado de tumores de crecimiento cada vez más rápido y más malignos.
3. Los estrógenos actúan como promotores de tumores aumentando la proliferación de células que responden a estrógenos como las células mamarias y endometriales.
4. La estimulación autocrina del crecimiento es un sistema de retroalimentación positiva en el que las células tumorales producen factores de crecimiento que estimulan su propia proliferación.
5. Las células cancerosas son menos adhesivas que las células normales y no están tan estrechamente reguladas mediante interacciones célula-célula y célula-matriz. Adicionalmente, las células cancerosas secretan proteasas que degradan los componentes de la matriz extracelular, facilitando la invasión de los tejidos adyacentes. Finalmente, las células cancerosas secretan factores angiogénicos que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos que suministran a los tumores con oxígeno y nutrientes que facilitan las metástasis y perdiendo a las células cancerosas un acceso más fácil al sistema circulatorio.
6. E6 interacciona con p53 pero no con Rb, para que no induzca transformación en combinación con el antígeno T mutante. Sin embargo, E7 se une e inactiva a Rb, de modo que inducirá la transformación en conjunción con el antígeno T mutante.
7. Los pacientes de SIDA están inmunodeprimidos y son, por lo tanto, susceptibles a la infección por virus oncogénicos.
8. Un proto-oncogén puede ser expresado a niveles anómalos o en tipos celulares anómalos. Estos cambios en la expresión pueden convertir un proto-oncogén en un oncogén a pesar de que se produzca una proteína estructuralmente normal. Un proto-oncogén puede ser activado de este modo mediante una translocación que lo pone bajo el control de un promotor activo o mediante fenómenos de amplificación génica.
9. *INK4* codifica el inhibidor p16 de Cdk, que inhibe los complejos Cdk4, 6/ciclina D. Dado que la fosforilación de Rb es la principal diana de Cdk4, 6/ciclina D, la sobreexpresión de p16 no tendrá ningún efecto en aquellas células en las que Rb haya sido inactivada.
10. *p53* es necesario para la detención del ciclo celular y la apoptosis en respuesta al ADN lesionado inducido mediante la radiación ionizante. Así, los tumores con genes de *p53* silvestres serán más sensibles a la radiación.
11. Imatinib es un inhibidor específico de la proteína quinasa Bcr/Abl expresada en las células de leucemia mieloide crónica. La inhibición de Bcr/Abl bloquea la proliferación de estas células tumorales. La resistencia a imatinib es causada la mayoría de las veces por mutaciones en Bcr/Abl que impiden la unión del principio activo.
12. Se cree que la proliferación y supervivencia de las células tumorales se hace dependiente de los oncogenes activados, a la vez que otras vías de señalización cobran una importancia secundaria. Esta dependencia por las células tumorales de los oncogenes activados se ha denominado adicción oncogénica. Sugiere que principios activos frente a un oncogén activado se dirigirían selectivamente contra las células tumorales, mientras que las células normales serían capaces de compensar empleando vías de señalización alternativas.

Glosario

abl Proto-oncogén que codifica una proteína-tirosina quinasa y que es activado por la translocación cromosómica en la leucemia mieloide crónica.

acetilación de histonas Modificación de histonas por la adición de grupos acetilo a residuos específicos de lisina.

ácido abscísico Hormona vegetal.

ácido desoxirribonucleico (ADN) Material genético de la célula.

ácido retinoico Molécula señalizadora sintetizada a partir de la vitamina A.

ácido ribonucleico (ARN) Polímero de ribonucleótidos.

ácido graso Cadena larga hidrocarbonada generalmente unida a un grupo carboxílico (COO^-).

ácidos nucleicos antisentido Acido nucléico (ARN o ADN) que son complementarios a un ARNm de interés y emplean para bloquear la expresión génica.

acoplamiento quimiosmótico *Generación de ATP a partir* de la energía almacenada en un gradiente protónico a través de una membrana.

actina Proteína abundante de 43-kd que polimeriza para formar filamentos del citoesqueleto.

actina [F] filamentosa Monómeros de actina polimerizados en filamentos.

actina [G] globular Monómeros de actina que no han sido ensamblados en filamentos.

α-actinina Proteína de unión a la actina que entrelaza los filamentos de actina para formar haces contráctiles.

activador transcripcional Factor de transcripción que estimulan a la misma.

acuaporina. Proteína de canal a través de la cual el agua atraviesa la membrana plasmática con gran rapidez

adaptina Proteína de unión a receptores de membrana que media en la formación de vesículas revestidas por clatrina.

adenina Purina que se empareja tanto con timina como con uracilo.

adenilato ciclasa *Enzima que cataliza la formación de AMP cíclico* a partir de ATP.

adenoma Tumor benigno que aparece en el epitelio glandular.

Adenovirus. Virus tumoral de ADN muy conocido.

ADF/cofilina Familia de proteínas de unión a la actina que desensamblan los filamentos de actina.

adhesión focal Sitio de unión de las células a la matriz extracelular en el que las integrinas se unen a haces de filamentos de actina.

adicción oncogénica La dependencia de las células cancerosas de la actividad continuada de los oncogenes.

ADN complementario (ADNc) Molécula de ADN que es complementaria a una molécula de ARNm, sintetizada *in vitro* por la transcriptasa inversa.

ADN glicosilasa Enzima de reparación del ADN que corta la unión de una purina o pirimidina a la desoxirribosa del esqueleto de una molécula de ADN.

ADN ligasa Enzima que sella roturas en las hebras de ADN.

ADN polimerasa Enzima que cataliza la síntesis de ADN.

ADN satélite ADN de secuencia sencilla repetitiva con una gran densidad que difiere de la mayoría del ADN genómico.

ADNc Molécula de ADN que es complementaria a una molécula de ARNm y es sintetizada en vitro por la transcriptasa inversa.

aislante *Una secuencia que divide la cromatina en dominios in*dependientes y previene que un *enhancer* o potenciador actúe sobre un promotor de un dominio separado.

Akt Proteína-serina/treonina quinasa que se activa por PIP^3 y que desempeña un papel clave en la señalización de la supervivencia celular.

alelo Copia de un gen.

almidón Polímero de restos de glucosa que es la principal reserva de carbohidratos en las plantas.

amiloplasto Plástido que almacena almidón.

aminoácido Bloques de construcción monoméricos de las proteínas que constan de un átomo de carbono unido a un grupo carboxílico, a un grupo amino, a un átomo de hidrógeno y a una cadena lateral específica.

aminoacil ARNt sintetasa Enzima que une un aminoácido específico a una molécula de ARNt que porta la secuencia correcta anticodón.

AMP cíclico (AMPc) Adenosina monofosfato en la que el grupo fosfato está unido con enlace covalente a los átomos de carbo*no 3′ y 5′, formando una estructura cíclica; importante segun*do mensajero en la respuesta de las células a una variedad de hormonas.

AMPc fosfodiesterasa Enzima que degrada el AMP cíclico.

amplificación génica Aumento en el número de copias de un gen como resultado de una replicación repetida de una región de ADN.

anafase Fase de la mitosis durante la cual las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso.

anafase A Movimiento de los cromosomas hijos hacia los polos del huso durante la mitosis.

anafase B Separación de los polos del huso durante la mitosis.

anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) Glicolípidos que contienen fosfatidilinositol y que anclan proteínas a la cara externa de la membrana plasmática.

anfipática Molécula que posee tanto regiones hidrofílicas como hidrofóbicas.

angiogénesis Formación de nuevos vasos sanguíneos.

anillo contráctil Estructura de actina y miosina II que se forma por debajo de la membrana plasmática durante la mitosis y media la citocinesis.

anquirina Proteína que une espectrina y conecta el citoesqueleto de actina con la membrana plasmática.

anticodón Secuencia nucleotídica del ARN de transferencia que forma pares de bases complementarios con una secuencia codón del ARN mensajero.

anticuerpo Proteína producida por los linfocitos B que se une a una molécula no propia.

anticuerpo monoclonal Anticuerpo producido por una línea clonal de linfocitos B.

antígeno Molécula contra la que se dirige el anticuerpo.

antiporte Transporte de dos moléculas en direcciones opuestas a través de la membrana.

aparato de Golgi Orgánulo citoplasmático implicado en el procesamiento y clasificación de proteínas y lípidos. En células vegetales, es también el lugar de síntesis de los polisacáridos de la pared celular.

apoptosis Proceso activo de muerte celular programada, caracterizado por la rotura del ADN cromosómico, la condensación de la cromatina y la fragmentación tanto del núcleo como de la célula.

apoptosoma Complejo proteico en el que se activa la caspasa-9 para iniciar la apoptosis tras la liberación del citocromo c de las mitocondrias.

Arabidopsis thaliana Planta pequeña, con floración, empleada como modelo en biología molecular vegetal y en biología del desarrollo vegetal.

ARF Proteína de fijación del GTP necesaria para la gemación de vesículas desde la red del *trans*-Golgi.

ARN de transferencia (ARNt) Molécula de ARN que actúan como adaptadores entre los aminoácidos y el ARNm durante la síntesis proteica.

ARN mensajero (ARNm) Molécula de ARN que sirve como molde para la síntesis proteica.

ARN pequeño de interferencia (ARNsi) ARN bicatenario no codificante corto que actúa en la vía de interferencia del ARN.

ARN pequeño nuclear (ARNsn) ARN nuclear que varían en tamaño desde las 50 a las 200 bases.

ARN pequeño nucleolares (ARNsno) ARN pequeño presente en el nucléolo que funcionan en el procesamiento de pre-ARNr.

ARN polimerasa Enzima que cataliza la síntesis del ARN.

ARN ribosomal (ARNr) ARN componente de los ribosomas.

ARN de SRP Componente citoplásmico pequeño de ARN de la SRP.

arqueobacteria Uno de los dos grupos principales de procariotas; muchas especies de arqueobacterias viven en condiciones extremas similares a aquellas que existían en los orígenes de la tierra.

β-arrestina Una proteína reguladora que termina la señalización desde los receptores acoplados a proteínas G, además de estimular otras vías de señalización corriente abajo.

ATM Una proteína quinasa que reconoce el ADN lesionado y desencadena la detención del ciclo celular.

ATP (adenosina 5'-trifosfato) Nucleósido trifosfato compuesto por adenina que sirve de almacén de energía libre en la célula.

ATP sintetasa Complejo proteico asociado a la membrana que acopla el transporte de protones, energéticamente favorable, a través de una membrana, a la síntesis de ATP.

ATPasa Na^+-K^+ Véase bomba Na^+-K^+.

ATR Una proteína quinasa semejante a ATR que desencadena la detención del ciclo celular en respuesta al ADN lesionado.

aurora quinasa Una familia de proteínas quinasas implicada en la formación del huso mitótico, la función del cinetócoro y la citocinesis.

autofagosoma Vesícula que contiene orgánulos internos encerrados por fragmentos de membranas citoplasmáticas que se fusiona con los lisosomas.

autofosforilación Una reacción en la que una proteína quinasa cataliza su propia fosforilación.

autofagia Degradación de proteínas citoplasmáticas y orgánulos al ser englobadas en vesículas citoplasmáticas que se fusionan con lisosomas.

autorradiografía Detección de moléculas marcadas radioisotópicamente por exposición a una película de rayos X.

auxina Hormona vegetal que controla muchos aspectos del desarrollo de la planta.

axonema Estructura fundamental de cilios y flagelos compuesta por un par central de microtúbulos rodeado por nueve dobletes de microtúbulos.

bacteriófago Virus bacteriano.

baculovirus Virus empleado frecuentemente como vector de expresión para la producción de proteínas eucarióticas en células de insecto.

balsa lipídica Dominio discreto de la membrana plasmática formado por agrupación de moléculas de colesterol y esfingolípidos.

barril-β Dominio transmembrana formado por el plegamiento de láminas en una estructura con forma de barril.

Bcl-2 Miembro de la familia de proteínas que regulan la muerte celular programada.

biblioteca de ADN recombinante Colección de clones de ADNc o genómico.

biblioteca de ADNc Colección de clones recombinantes de ADNc.

biblioteca genómica Colección de clones de ADN recombinante que, de forma colectiva, contienen el genoma de un organismo.

bicapa fosfolipídica Estructura básica de las membranas biológicas, donde las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos están inmersas en el interior de la membrana, y sus grupos polares se exponen a la solución acuosa a ambos lados de dicha membrana.

bioinformática Uso de métodos computacionales para analizar grandes cantidades de datos biológicos, como las secuencias genómicas.

biología de sistemas Un nuevo campo de la biología en el que los enfoques experimentales a gran escala se combinan con el análisis cuantitativo y la modelación para el estudio de los sistemas biológicos complejos.

bomba de Na^+-K^+ Bomba iónica que transporta Na^+ fuera de la célula y K^+ dentro de la célula.

bomba iónica Proteína que acopla la hidrólisis de ATP al transporte de iones a través de una membrana.

borde en cepillo Superficie de una célula (p. ej., una célula epitelial del intestino) que contiene una capa de microvellosidades.

brasinosteroide Hormona esteroídica de plantas.

cadena de transporte electrónico Serie de transportadores mediante los cuales los electrones se transportan desde un estado de energía superior a uno inferior.

cadherinas Molécula de adhesión celular que forma uniones estables célula-célula en las uniones adherentes y en los desmosomas.

Caenorhabditis elegans Nematodo empleado como modelo pluricelular sencillo en biología del desarrollo.
caja TATA Secuencia reguladora de ADN encontrada en los promotores de muchos genes eucarióticos transcritos por la ARN polimerasa II.
callo Masa indiferenciada de células vegetales en cultivo.
CaM quinasa Miembro de una familia de proteína quinasas que se activan por la unión de Ca^{2+}/calmodulina.
canal activado por ligando Canal iónico que se abren en respuesta a la unión de moléculas señalizadoras.
canal iónico Proteína que interviene en el tránsito rápido de iones a través de una membrana, mediante la formación de poros abiertos a través de la bicapa fosfolipídica.
canales activados por voltaje Canal iónico que se abren en respuesta a variaciones en el potencial eléctrico.
calmodulina Proteína de fijación del calcio.
cáncer Tumor maligno.
caperuza de 5′ metilguanosina Estructura constituida por GTP y azúcares metilados que se añade al extremo 5′ de los ARNm de los eucariotas.
carbohidrato Molécula de fórmula $(CH_2O)_n$. Los carbohidratos incluyen, tanto azúcares simples, como polisacáridos.
carcinógeno Agente inductor de cáncer.
carcinoma Cáncer de células epiteliales.
cardiolipina Fosfolípido que contiene cuatro cadenas hidrocarbonadas.
carioferina Receptor de transporte nuclear.
caspasas Miembro de una familia de proteasas que ocasionan la muerte celular programada.
catenina Grupo de proteínas citoplasmáticas (como α-catenina y β-catenina) que unen los filamentos de actina con cadherinas en las uniones adherentes..
catalasa Enzima que descompone peróxido de hidrógeno.
caveolas Pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática que pueden estar implicadas en la endocitosis.
caveolina Una proteína que interacciona con las balsas lipídicas y forma las caveolas.
CCND1 El gen que codifica para la ciclina D1, que es un oncogén en una diversidad de cánceres humanos.
Cdc42 Miembro de la subfamilia Rho de proteínas de unión al GTP de bajo peso molecular.
Cdk Miembro de una familia de proteína quinasas dependiente de ciclinas que controlan el ciclo celular en la célula eucariótica.
Cdk1 Proteína-serina/treonina quinasa, que es un regulador clave de la mitosis en las células eucariotas.
Cdks Proteína quinasas ciclina dependientes que controlan el ciclo celular de las eucariotas. Véase también Cdk1.
célula de esclerénquima Tipo de célula vegetal caracterizadas por gruesas paredes celulares que proporcionan apoyo estructural a la planta.
célula madre Célula que se divide para dar lugar a células hijas que pueden diferenciarse o permanecer como células madre.
célula parenquimática Clase de célula vegetal responsable de la mayoría de las actividades metabólicas.
célula procariótica Célula que carece de una envoltura nuclear y orgánulos citoplasmáticos (bacteria)
células epidérmicas Tipo de célula que forma una capa protectora en las superficies de plantas y animales.
células epiteliales Tipo de célula que forma de láminas (tejido epitelial) que recubren la superficie del cuerpo y delimitan los órganos internos.
célula eucariota Célula dotada de una envoltura nuclear, orgánulos citoplasmáticos y cromosomas lineales.
células madre embrionarias (ES) Células cultivadas a partir de embriones tempranos.
célula madre totipotencial inducida Célula somática adulta que se reprograma en cultivo celular para comportarse como una célula madre embrionaria.
celulosa Principal componente estructural de la pared celular vegetal, polímero lineal de restos de glucosa unidos mediante enlaces glicosídicos β(1↔4).
celulosa sintasa Enzima que cataliza la síntesis de celulosa.
CENP-A Véase H3 centromérica
centrifugación de velocidad Separación de partículas basadas en sus tasas de sedimentación.
centrifugación diferencial Método empleado para separar los componentes de las células en base a su tamaño y densidad.
centrifugación por equilibrio Separación de partículas en función de la densidad, mediante centrifugación, hasta el equilibrio en un gradiente de una sustancia densa.
centrifugación por gradiente de densidad Método de separación de partículas por centrifugación a través de gradiente de una sustancia densa, como sacarosa o cloruro de cesio.
centriolo Estructura cilíndrica consistente en nueve tripletes de microtúbulos en los centrosomas de la mayoría de las células animales.
centro activo Región de una enzima que une sustratos y cataliza una reacción enzimática.
centro de organización de microtúbulos Punto de anclaje cerca del centro de la célula desde donde la mayoría de los microtúbulos se extienden hacia fuera.
centrómero Región del cromosoma especializada que conecta las cromátidas hermanas y las fija al huso mitótico.
centrosoma Centro de organización microtubular en células animales.
chaperona Proteína que facilita el correcto pliegue o ensamblaje de otras proteínas.
chaperonina Familia de proteínas de choque térmico dentro de las cuales se produce el pliegue proteico.
cianobacteria Procariotas mayores y más complejos en los cuales se cree que evolucionó la fotosíntesis.
ciclina Miembro de una familia de proteínas que regulan la actividad de Cdks y controlan la progresión a través del ciclo celular.
ciclina G_1 (Cln) Ciclina de levadura que controlan el paso a través de START.
ciclo de Calvin Serie de reacciones mediante las cuales seis moléculas de CO_2 se transforman en glucosa.
ciclo de Krebs Ver ciclo de ácido cítrico.
ciclo del ácido cítrico Serie de reacciones en las cuales el acetil CoA se oxida a CO_2. Ruta central del metabolismo oxidativo.
ciclo del glioxilato Conversión de ácidos grasos a carbohidratos en vegetales.
cilio Proyección de la membrana plasmática, constituida por microtúbulos, que mueve a la célula a través de fluidos o al fluido sobre la célula.
cinetocoro Estructura especializada constituida por proteínas sujetas a un centrómero y que interviene en la fijación y movimiento de los cromosomas a lo largo del huso mitótico.
cinturón de adhesión Estructura con forma de cinturón en torno a las células epiteliales, en las que un haz contráctil de filamentos de actina está asociado a la membrana plasmática.
citocalasina Fármaco que bloquea la elongación de los filamentos de actina.
citocinesis División de una célula tras la mitosis o meiosis.
citocromo *c* Una proteína periférica de la membrana mitocondrial que transporta electrones durante la fosforilación oxidativa.
citocromo oxidasa Complejo proteico de la cadena de transporte electrónico que acepta electrones desde el citocromo *c* y los transfiere al O_2.
citoesqueleto Red de filamentos proteicos que se extiende a través del citoplasma de las células eucariotas. Proporciona el armazón estructural de la célula y es responsable de los movimientos celulares.
citómetro de flujo Instrumento que mide la intensidad de la fluorescencia de células individuales.

citoquina Factor de crecimiento que interviene en la regulación de las células sanguíneas y los linfocitos.
citoquinina Hormona vegetal que regula la división celular.
citosina Pirimidina que se empareja con guanina.
clatrina Proteína que reviste la superficie citoplasmática de las membranas celulares, se ensambla en celosías en forma de cesta y dirige la formación de vesículas.
clon molecular Véase molécula recombinante.
clonación molecular Inserción de un fragmento de ADN de interés en una molécula de ADN (vector) que es capaz de replicación independiente en una célula huésped.
clonación reproductiva Empleo de la transferencia nuclear para crear un organismo clonado.
clonación terapéutica Procedimiento en el que la transferencia nuclear en oocitos podría utilizarse para producir células madre embrionarias para su uso en la terapia de trasplante.
clorofila Pigmento fotosintético principal de células vegetales.
cloroplasto Orgánulo responsable de la fotosíntesis en las células de plantas y algas verdes.
***c*-myc** Protooncogén que codifica un factor de transcripción y frecuentemente es activado por la translocación cromosómica o la amplificación génica en tumores humanos.
coactivador Proteína que interacciona con un factor de transcripción para estimular la transcripción.
código de histonas Combinaciones de modificaciones específicas de las histonas que se cree que regulan la actividad transcripcional de la cromatina.
código genético Correspondencia entre tripletes de nucleótidos y aminoácidos en las proteínas.
codón Unidad básica del código genético; uno de los 64 tripletes de nucleótidos que codifican un aminoácido o una secuencia de terminación.
coenzima Moléculas orgánicas de bajo peso molecular que colaboran con las enzimas en la catálisis de las reacciones biológicas.
coenzima A (CoA) Coenzima que actúa como transportador de grupos acetilo en reacciones metabólicas.
coenzima Q Pequeña molécula liposoluble que transporta electrones entre complejos proteicos en la cadena de transporte electrónico mitocondrial.
cohesinas Proteína que mantiene la conexión entre cromátidas hermanas.
cola de poli-A Extensión de aproximadamente 200 nucleótidos de adenina que se añade a los extremos 3' de los ARNm eucariotas.
colágeno Principal proteína estructural de la matriz extracelular.
colcemida Fármaco que inhibe la polimerización de microtúbulos.
colchicina Fármaco que inhibe la polimerización de microtúbulos.
colénquima Células vegetales caracterizadas por gruesas paredes celulares; proporcionan apoyo estructural a la planta.
colesterol Lípido constituido por cuatro anillos hidrocarbonados. El colesterol es el principal constituyente de las membranas plasmáticas de células animales y es el precursor de hormonas esteroideas.
complejo ARP 2/3 Complejo proteico que se une a los filamentos de actina e inicia la formación de ramificaciones.
complejo de anillo de γ-tubulina Un complejo proteico que nuclea la formacón de microtúbulos.
Complejo de Golgi Véase Aparato de Golgi.
complejo de orientación Complejo proteína que dirige las proteínas hacia los cloroplastos.
complejo de unión Región de contacto célula-célula que contiene una unión estrecha, una unión adherente y un desmosoma.
complejo del citocromo *bf* Complejo proteico de la membrana del tilacoide que transporta electrones durante la fotosíntesis.
complejo del origen de replicación (ORC) Complejo proteico que inicia la replicación del ADN en los puntos de origen en levaduras.
complejo del poro nuclear Gran estructura que forma un canal de transporte a través de la envuelta nuclear.
complejo focal Un pequeño grupo de integrinas que se unen a la matriz extracelular que inicia la formación de una adhesión focal.
complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) Ubiquitina ligasa que desencadena la progresión de la metafase a la anafase mediante la señalización de la degradación de ciclina B y cohesinas.
complejo sinaptonémico Estructura proteica en forma de cremallera que se forma a lo largo de los cromosomas homólogos emparejados durante la meiosis.
complejo Tic Complejo de translocación proteica de la membrana interna del cloroplasto.
complejo Tim Complejo de translocación proteica de la membrana mitocondrial interna.
complejo Toc Complejo de translocación proteica de la membrana externa del cloroplasto.
complejo Tom Complejo de translocación proteica de la membrana mitocondrial externa.
complejo WASP/Scar Un complejo proteico que estimula la ramificación de los filamentos de actina.
condensina Un complejo proteico que dirige la condensación cromosómica durante la metafase.
conexina Miembro de la familia de proteínas transmembrana que forma las uniones de tipo *gap*.
conexón Un cilindro formado por seis conexinas en la membrana plasmática.
COPI y COPII Las dos proteínas diferentes de la clatrina que recubren las vesículas de transporte (COP indica proteína de la envuelta: *coat protein*).
corrección de pruebas Retirada selectiva de bases mal apareadas por parte de la ADN polimerasa.
correpresor Proteína que se asocia con represores para inhibir la expresión génica, a menudo modificando la estructura de la cromatina.
córtex celular Red de actina subyacente a la membrana plasmática.
corticoesteroide Hormonas esteroideas producidas por la glándula adrenal.
cósmido Vector que contiene secuencias del bacteriófago λ, secuencias de resistencia a antibióticos, y un origen de replicación. Puede acomodar grandes insertos de ADN de incluso 45 kb.
CREB Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico. Un factor de transcripción que se activa por acción de la proteína quinasa dependiente de AMPc.
cremallera de leucina Dominio de dimerización proteico que contiene restos repetidos de leucina; se encuentra en muchos factores de transcripción.
cresta Pliegue en la membrana mitocondrial interna que se extiende dentro de la matriz.
criofractura Método de microscopia electrónica que consiste en que las muestras se congelan en nitrógeno líquido y después se fracturan para escindir la bicapa lipídica, mostrando así las caras internas de las membranas celulares.
cristalografía de rayos X Método en el que el patrón de difracción de rayos X es utilizado para determinar la organización de los átomos individuales dentro de una molécula.
cromatina Complejo fibroso de ADN eucariota y proteínas histonas. Véase histonas, nucleosoma y cromatosoma.
cromatografía de afinidad de ADN Método empleado para aislar proteínas de unión al ADN basado en su unión a secuencias específicas de ADN.
cromatosoma Subunidad de cromatina que consta de 166 pares de bases de ADN enrolladas alrededor de un núcleo de histona y mantenidas en su posición por un conector a la histona.

cromoplasto Plástido que contiene carotenoides.
cromosoma artificial bacteriano (BAC) Tipo de vector empleado en la clonación de fragmentos grandes de ADN en bacterias.
cromosoma artificial de levadura (YAC) Vector que puede ser replicado como un cromosoma en células de levadura y que puede acomodar inserciones muy grandes de ADN (de cientos de kb).
cromosoma artificial P1 (PAC) Vector empleado para la clonación de fragmentos grandes de ADN en *E. coli*.
cromosoma politénico Cromosoma gigante encontrado en algunos tejidos de *Drosophila* que surge de la replicación repetida de hebras de ADN que no se separan entre sí.
cromosomas Portador de genes, consistentes en moléculas largas de ADN y proteínas asociadas.
cuerpo basal Estructura similar a un centriolo que inicia el crecimiento de los microtúbulos axonémicos y ancla los cilios y flagelos a la superficie de la célula.
cuerpo polar Célula pequeña formada por la división celular asimétrica que sigue a la meiosis de los oocitos.
cultivo primario Cultivo celular establecidos a partir de un tejido.

deaminasa inducida por activación (DIA) Una enzima expresada en linfocitos B que deamina los residuos de citosina en el ADN para formar uracilo en las regiones variables de los genes de inmunoglobulinas. DIA es necesaria tanto para la recombinación de cambio de clase como para la hipermutación somática.
decaimiento mediado por ARNm sin sentido Degradación de ARNm que carecen de marcos de lectura abiertos completos.
desmocolina Tipo de cadherina transmembrana que une los citoesqueletos de filamentos intermedios de células adyacentes en los demosomas.
desmogleína Tipo de cadherina transmembrana que une los citoesqueletos de filamentos intermedios de células adyacentes en los demosomas
desmina Una proteína de los filamentos intermedios expresada en células musculares.
desmosoma Región de contacto entre células epiteliales en la cual los filamentos de queratina se anclan a la membrana plasmática. Véase también hemidesmosoma.
2'-desoxirribosa Azúcar de cinco átomos de carbono que se encuentra en el ADN.
diacilglicerol Mensajero secundario formado por la hidrólisis de PIP_2, que activa la proteína quinasa C.
diacinesis Estadio final de la profase de la meiosis I durante la cual los cromosomas se condensan por completo y la célula progresa a metafase.
didesoxinucleótidos Nucleótido que carecen del grupo hidroxilo en 3' y que se emplean como nucleótidos terminadores de cadena en la secuenciación de ADN.
difusión facilitada Transporte de moléculas a través de una membrana mediante proteínas transportadoras o de canal.
difusión pasiva Difusión de pequeñas moléculas hidrofóbicas a través de una bicapa fosfolipídica.
dímero de pirimidina Forma común de lesión en el ADN causada por la luz UV donde las pirimidinas adyacentes se unen para formar un dímero.
dinactina Una proteína que actúa junto con la dineína citoplasmática para desplazar mercancías sobre los microtúbulos.
dinamina Una GTPasa asociada a membrana implicada en la gemación vesicular.
dineína Proteína motora que migra a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo negativo.
dineína axonémica Tipo de dineína que se encuentra en cilios y flagelos.
dineína citoplásmica Forma de la dineína que se asocia con los microtúbulos en el citoplasma.
diploide Organismo o célula que porta dos copias de cada cromosoma.
diploteno Estadio de la meiosis I donde los cromosomas homólogos se separan longitudinalmente pero permanecen asociados en el quiasma.
distrofina Proteína citoesquelética de las células musculares.
doble-híbrido de levaduras Un método genético para detectar interacciones proteicas en células de levadura.
dogma central Concepto de que la información genética fluye de ADN a ARN y a proteínas.
dolicol fosfato Molécula lipídica del retículo endoplasmático sobre la que se unen los oligosacáridos para la glicosilación de las proteínas.
dominante Alelo que determina el fenotipo de un organismo cuando más de un alelo está presente.
dominio apical *Superficie libre expuesta de una célula epitelial polarizada.*
dominio basolateral Región superficial de una célula epitelial polarizada que está en contacto con células adyacentes o con la matriz extracelular.
dominio de dedo de zinc Tipo de dominio de unión de ADN constituido por bucles que contienen restos de cisteína e histidina, a los que se unen iones de zinc.
dominio PTB Dominio proteico que se une a los péptidos que contienen fosfotirosinas.
dominio SH2 Dominio proteico de aproximadamente 100 aminoácidos que se une a péptidos que contienen fosfotirosina.
dominios Regiones compactas y globulares de las proteínas que forma la unidad básica de la estructura terciaria.
Drosophila melanogaster Especie de mosca de la fruta comúnmente empleada para estudios de genética y desarrollo animal.

E2F Familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular y la replicación del ADN.
ecdisona Hormona esteroidea de insectos que desencadena la metamorfosis.
ectodermo Capa externa germinal; da lugar a tejidos que incluyen la piel y el sistema nervioso.
ecuación de Nernst Relación entre concentración iónica y potencial de membrana.
edición de ARN Procesos de tratamiento del ARN distintos del *splicing* que alteran las secuencias de los ARMm que codifican proteínas.
eicosanoide Clase de lípidos, incluyendo prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxanos y leucotrienos, que actúan en señalización autocrina y paracrina.
elaioplastos Plástico que almacenan lípidos.
elastina Componente principal de las fibras elásticas.
electroforesis en gel Método en el que se separan moléculas en base a su migración en un campo eléctrico.
electroforesis en gel bidimensional Un método para la separación de proteínas celulares basado en la carga y el tamaño.
electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida Método comúnmente usado para la separación de proteínas por electroforesis en gel en función de su tamaño.
electroporación Introducción de ADN en células mediante su exposición a un breve pulso eléctrico.
elemento barrera Ver aislante
elemento de control que actúa en *cis* Secuencia de ADN regulador que sirve de sitio de unión de proteínas y controla la transcripción de los genes adyacentes.
elemento de respuesta al AMPc (CRE) Secuencia reguladora que media la respuesta transcripcional de los genes diana al AMPc.
elemento de respuesta al suero (SRE) Secuencia reguladora que es reconocida por el factor de respuesta al suero y que media la inducción transcripcional de diversos genes inmediato-tempranos en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.

elemento semejante a un retrovirus Retrotransposón que es estructuralmente similar a un retrovirus.
elemento transponible Véase transposón.
Elk-1 Factor de transcripción que es activado por la fosforilación de ERK e induce la expresión de genes inmediatos-tempranos.
encaje inducido Modelo de acción enzimática en el que las configuraciones tanto de la enzima como del sustrato se modifican por la unión del sustrato.
encefalina Neuropéptido que actúa como un analgésico natural.
endocitosis Entrada de material extracelular en vesículas formadas a partir de la membrana plasmática.
endocitosis en fase fluida Entrada no selectiva de fluidos extracelulares durante la endocitosis.
endocitosis mediada por receptor Entrada selectiva de macromoléculas que se unen a receptores de la superficie celular, que se concentran en depresiones revestidas por clatrina.
endodermo Capa interna germinal; da lugar a los órganos internos.
endonucleasa AP Enzima de reparación del ADN que corta en puntos próximos a sitios apirimidínicos o apurínicos en el ADN.
endonucleasa de restricción Enzima que corta el ADN en una secuencia específica.
endorfina Neuropéptido que actúa como un analgésico natural.
endosoma Compartimento vesicular implicado en la clasificación y transporte a los lisosomas del material tomado por endocitosis.
endosimbiosis Relación simbiótica en donde una célula reside en el interior de una célula mayor.
energía de activación Energía requerida para elevar una molécula a su estado de transición para llevar a cabo una reacción química.
energía libre de Gibbs (G) Función termodinámica que combina los efectos de la entalpía y la entropía para predecir la dirección energéticamente favorable de una reacción química.
enfermedades del almacenamiento de los lisosomas Familia de enfermedades caracterizadas por la acumulación de material sin degradar en los lisosomas de los individuos afectados.
enlace fosfodiéster Enlace entre el fosfato 5′ de un nucleótido y el hidroxilo 3′ de otro.
enlace de alta energía Enlace químico que libera una gran cantidad de energía libre cuando es hidrolizado.
enlace glicosídico Enlace formado entre restos de azúcar en oligosacáridos o polisacáridos.
enlace peptídico Enlace que une aminoácidos en las cadenas polipeptídicas.
ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética Ensayo para la unión de una proteína a una secuencia específica de ADN.
entactina Proteína de la matriz extracelular que interacciona con las lamininas y con el colágeno de tipo IV en la lámina basal.
envoltura nuclear Barrera que separa el núcleo del citoplasma, compuesta de una membrana interna y otra externa, una lámina nuclear y complejos de poro nuclear.
enzima Proteína o ARN que catalizan reacciones biológicas.
ErbA Protooncogén que codifica un receptor de la hormona tiroidea.
***erb*B-2** Protooncogén que codifica un receptor proteína tirosina-quinasa que frecuentemente está amplificado en los carcinomas mamario y ovárico.
eritrocitos Glóbulos rojos sanguíneos.
ERbA Producto del proto-oncogén erbA. Receptor de la hormona tiroidea.
ERK Miembro de la familia de las quinasas MAP que juega un papel central en la proliferación celular inducida por factores de crecimiento.
***Escherichia coli* (*E. coli*)** Especie de bacterias que ha sido ampliamente utilizada como sistema modelo para la biología molecular.
escinucleasa Complejo proteico que escinde el ADN dañado durante la reparación por escisión de nucleótidos en bacterias.
esfingomielina Fosfolípido constituido por dos cadenas hidrocarbonadas unidas a una cabeza polar que contiene serina.
espectrina Una de las principales proteínas de fijación de la actina del córtex celular.
espectrometría de masas Un método para identificar compuestos basados en la determinación precisa de su masa. La espectrometría de masas se emplea habitualmente para la identificación de proteínas.
espliceosoma Complejo grandes de ARNsn y proteínas que catalizan el *splicing* de pre-ARNm.
estado de transición Estado energético elevado a través del cual deben pasar los sustratos durante el curso de una reacción enzimática.
estereocilio Microvellosidad especializada de las células auditivas.
ésteres de forbol Clase de promotores de tumores que estimulan a la proteína quinasa C al actuar como análogos del diacilglicerol.
estimulación autocrina del crecimiento Estimulación de la proliferación celular como resultado de la producción de un factor de crecimiento por parte de una célula que responde a dicho factor.
estrógeno Hormona esteroidea producida por los ovarios.
estroma Compartimento de los cloroplastos que se encuentra entre la envuelta y la membrana tilacoidea.
estructura cuaternaria Interacciones entre cadenas polipeptídicas en las proteínas que están constituidas por más de un polipéptido.
estructura primaria Secuencia de aminoácidos en una cadena polipeptídica.
estructura secundaria Disposición regular de los aminoácidos dentro de regiones localizadas de una cadena polipeptídica. Véase α-hélice y lámina β.
estructura terciaria Pliegue tridimensional de una cadena polipeptídica que confiere a la proteína su forma funcional.
etileno Hormona vegetal responsable de la maduración de la fruta.
etioplasto Estadio intermedio del desarrollo del cloroplasto en el que la clorofila no se ha sintetizado.
eubacterias Uno de los dos grupos principales de procariotas, incluyendo las especies más comunes de bacterias.
eucromatina Cromatina interfásica descondensada y transcripcionalmente activa.
exocisto Un complejo proteico en la membrana plasmática donde se produce la exocitosis.
exón Segmento de un gen que se incluye en un ARN sometido a corte y empalme.
exonucleasa Enzima que hidroliza moléculas de ADN tanto en dirección 5′ a 3′ como 3′ a 5′.
exportina Receptor proteico que reconoce señales de exportación nuclear y dirige el transporte desde el núcleo al citosol.
expresión transitoria Expresión de ADN plasmídico no integrado que se ha introducido en células cultivadas.

FAK (quinasa de adhesión focal) Proteína-tirosina quinasa no receptora que desempeña un papel clave en la señalización de las integrinas.
factor asociado a TBP (TAF) Polipéptido asociado con TBP en el factor de transcripción general TFIID.
factor citostático (CSF) Factor citoplásmico que detiene la meiosis del oocito en la metafase II.
factor de crecimiento Polipéptido que controla el crecimiento de la célula animal y su diferenciación.
factor de crecimiento anclado a la membrana Factor de crecimiento asociado a la membrana plasmática que actúan como moléculas de señalización durante el contacto célula-célula.

factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) Factor de crecimiento liberado desde las plaquetas en la coagulación sanguínea para estimular la proliferación de los fibroblastos.
factor de crecimiento epidérmico (EGF) Factor de crecimiento que estimula la proliferación celular.
factor de crecimiento neuronal (NGF) Factor de crecimiento polipeptídico que regula el desarrollo y supervivencia de las neuronas.
factor de crecimiento transformante β (TGF-β) Factor de crecimiento polipeptídico que generalmente inhibe la proliferación de las células animales.
factor de elongación Proteína implicada en la fase de elongación de la transcripción o traducción.
factor de iniciación Proteína que funciona en la etapa de iniciación de la traducción.
factor de liberación Proteína que reconoce a los codones de terminación y finaliza la traducción del ARNm.
factor de necrosis tumoral (TNF) Factor de crecimiento polipeptídico que induce a la inflamación celular programada.
factor de remodelación de la cromatina Proteína que desorganiza la estructura cromatínica al alterar los sitios de contacto del ADN con las histonas.
factor de respuesta al suero (SRF) Factor de transcripción que se une al elemento de respuesta al suero.
factor de transcripción Proteína que regula la actividad de la ARN polimerasa.
factor de transcripción generales Factor de transcripción que forma parte de la maquinaria general de transcripción.
factor promotor de maduración (MPF) Complejo de Cdk1 y ciclina B que promueve la entrada en la fase M, tanto de la mitosis como de la meiosis.
factor *trans*-activador Proteína reguladoras de la transcripción.
factor de intercambio de nucleotidos de guanina Proteína que actúa sobre pequeñas proteínas de unión a GTP para estimular el intercambio del GDP unido por GTP.
factores de remodelación del nucleosoma Proteínas que alteran la estructura de la cromatina, permitiendo a los factores de transcripción unirse al ADN nucleosomal.
fagocitosis Entrada de partículas grandes, como bacterias, a la célula.
fagolisosoma Lisosoma que se ha fusionado con un fagosoma o un autofagosoma.
fagosoma Vacuola que contiene una partícula internalizada por fagocitosis.
faloidina Fármaco que se fija a los filamentos de actina y previene su desensamblaje.
familia de proteínas armadillo Una familia de proteínas, incluida la β-catenina, que asocia las cadherinas con el citoesqueleto en las uniones célula-célula estables.
familia génica Grupo de genes relacionados que han surgido a partir de la duplicación de un ancestro común.
fase G_1 Fase del ciclo celular entre el final de la mitosis y el comienzo de la síntesis de ADN.
fase G_2 Fase del ciclo celular entre el final de la fase S y el comienzo de la mitosis.
fase M Fase mitótica del ciclo celular.
fase S Fase del ciclo celular durante la cual se produce la replicación del ADN.
feedforward relay Un mecanismo regulador en el que un elemento de una vía de señalización estimula a un componente corriente abajo.
fecundación Unión de un espermatozoide con un óvulo
fenotipo Apariencia física de un organismo.
fibra de estrés Haz de filamentos de actina anclado en puntos de adhesión celular a la matriz extracelular.
fibra elástica Fibra proteica que están presentes en la matriz extracelular de los tejidos conectivos en órganos que se deforman y después vuelven a su forma original.
fibra muscular célula de gran tamaño del músculo esquelético, que se forman por la fusión de muchas células individuales durante el desarrollo.
fibrillas de colágeno Fibrilla formada por el ensamblaje de moléculas de colágeno en una organización escalonada regular.
fibroblasto Tipo de célula que se encuentra en el tejido conectivo.
fibronectina Principal proteína de adhesión de la matriz extracelular.
fijación de nitrógeno Reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) a NH_3.
filamento intermedio Filamento citoesquelético de aproximadamente 10 nm de diámetro que proporciona fuerza mecánica a las células en los tejidos. Véase también queratinas y neurofilamentos.
filamina Proteína de unión a la actina que entrelaza filamentos de actina para formar redes.
filopodio Proyección delgada de la membrana plasmática soportada sobre haces de actina.
fimbrina Proteína que forma haces de actina y está implicada en la formación de las proyecciones de la superficie celular.
flagelo Proyección con base microtubular de la membrana plasmática que es responsable de movimiento celular.
flavín adenín dinucleótido ($FADH_2$) Coenzima que actúa como transportador electrónico en reacciones de oxidación/reducción.
flipasa Proteína que cataliza la traslocación de lípidos a través de la membrana del retículo endoplasmático.
flujo electrónico cíclico Ruta de transporte electrónico asociada al fotosistema I que produce ATP sin la síntesis de NADPH.
fodrina Espectrina no eritroide.
footprinting Método utilizado para identificar los sitios de unión de proteínas al ADN.
formina Una proteína de unión a la actina que nuclea y polimeriza filamentos de actina.
Fos Factor de transcripción, codificado por un protooncogén, que es inducido en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.
fosfatidilcolina Fosfolípido del glicerol con una cabeza formada a partir de la colina.
fosfatidiletanolamina Fosfolípido del glicerol cuya cabeza está formada a partir de la etanolamina.
fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa) Componente fosfolipídico secundario de la cara interna de la membrana plasmática. Las hormonas y los factores de crecimiento estimulan su hidrólisis mediante la fosfolipasa C, dando lugar a segundos mensajeros como el diacilglicerol y el inositol trifosfato.
fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) Componente fosfolipídico menor de la parte interna de la membrana plasmática. Las hormonas y factores de crecimiento estimulan su hidrólisis por fosfolipasa c, produciendo los segundos mensajeros diacilglicerol e inositol trifosfato.
fosfatidilinositol Fosfolípido de glicerol con un grupo cabeza formado a partir de inositol
fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3) Segundo mensajero formado por la fosforilación de PIP_2.
fosfatidilserina Fosfolípido del glicerol con una cabeza formada a partir de la serina.
fosfolipasa C Enzima que hidroliza PIP_2 para formar los segundos mensajeros diacilglicerol e inositol trifosfato.
fosfolípido Una familia de moléculas que son los componentes principales de las membranas celulares y se componen de dos cadenas de hidrocarburo (por lo general, ácidos grados) unidos a un grupo polar que contiene un fosfato.
fosforilación Adición de un grupo fosfato a una molécula.
fosforilación oxidativa Síntesis de ATP a partir del ADP, que está acoplada a la transferencia, energéticamente favorable, de electrones a un oxígeno molecular. Éste actúa como aceptor final en una cadena de transporte electrónico.

Fotocentro Conjunto de pigmentos fotosintéticos localizado en la membrana tilacoidea de los cloroplastos.
fotorreactivación Mecanismo de reparación del ADN donde se emplea energía solar para escindir los dímeros de pirimidina.
fotorrespiración Proceso de metabolización de un derivado de la fotosíntesis.
fotosíntesis Proceso mediante el cual las células aprovechan la energía de la luz solar y sintetizan glucosa a partir de CO_2 y agua.
fotosistema I Complejo proteico de la membrana del tilacoide que emplea la energía absorbida de la luz solar para sintetizar NADPH.
fotosistema II Complejo proteico en la membrana del tilacoide que usa la energía absorbida de la luz solar para sintetizar ATP.
fragmentos de Okazaki Corto fragmento de ADN sintetizado para formar la hebra retrasada de ADN.

G_0 Estado de reposo en el que las células permanecen metabólicamente activas pero no proliferan.
gen Segmento de ADN que codifica una cadena polipeptídica o una molécula de ARN.
gen de estabilidad Un gen que actúa para mantener la integridad del genoma y cuya pérdida puede dar lugar al desarrollo de un cáncer.
gen de respuesta secundaria Un gen cuya inducción después de la estimulación con factores de crecimiento de una célula requiere síntesis proteica.
gen supresor de tumores Gen cuya inactivación conduce al desarrollo de un tumor.
gen inmediato-temprano Gen cuya transcripción es inducida rápidamente en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.
genética inversa Análisis de la función génica por la introducción de mutaciones en un gen clonado.
genómica El análisis sistemático de genomas celulares completos.
genotipo Composición genética de un organismo.
giberelina Hormona vegetal.
glicerol fosfolípidos Fosfolípidos que consisten en dos ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol.
glicocálix Revestimiento carbohidratado que recubre la superficie celular.
glicolípido Lípido que consta de dos cadenas hidrocarbonadas unidas a una cabeza polar que contiene carbohidratos.
glicoproteína Proteína unida a oligosacáridos.
glicosaminoglicano (GAG) Polisacárido de la matriz extracelular, constituyente de geles.
glicosidasa Una enzima que elimina residuos de azúcar de su sustrato.
glicosilación Adición de carbohidratos a las proteínas.
glicosiltransferasa Una enzima que añade residuos de azúcar a su sustrato.
glioxisoma Peroxisoma en los que tienen lugar las reacciones del ciclo del glioxilato.
glucocorticoide Esteroide producido por la glándula adrenal que actúa para estimular la producción de glucosa.
glucógeno Polímero de restos de glucosa que es la principal fuente de almacenamiento de carbohidratos en los animales.
glucólisis Degradación anaeróbica de glucosa.
gluconeogénesis Síntesis de glucosa.
GMP cíclico (GMPc) Guanosina monofosfato donde el grupo fosfato está covalentemente unido a los átomos de carbono 3′ y 5′, formando una estructura cíclica; importante segundo mensajero en la respuesta de las células a una variedad de hormonas y en la visión.
GMPc fosfodiesterasa Enzima que degrada GMPc.
gradiente electroquímico Diferencia en la concentración química y en el potencial eléctrico a través de una membrana.
granulocito Tipo de célula sanguínea que están implicadas en reacciones inflamatorias.
grasas Véase triacilgliceroles.
grupo prostético Pequeña molécula unida a una proteína.
guanina Purina que se empareja con citosina.
guanilato ciclasa Enzima que cataliza la formación de GMP cíclico a partir de GTP.

H3 centromérica (H3Cen) Variante de la hitota H3 que está presente en los centrómeros
haces contráctiles Haz de filamentos de actina que interaccionan con la miosina II y son capaces de contracción.
haploide Organismo o célula que presenta una copia de cada cromosoma.
haz de actina Filamentos de actina que se entrecruzan en formaciones densamente empaquetadas.
hebra directora Hebra del ADN sintetizada de forma continua en la dirección de avance de la horquilla de replicación.
hebra retrasada Hebra del ADN sintetizada de forma opuesta a la dirección de avance de la horquilla de replicación, mediante la unión de los fragmentos de Okazaki.
Hedgehog Molécula secretada de señalización que estimula una vía que regula el destino celular en el transcurso del desarrollo embrionario.
helicasa Enzima que cataliza el enrollamiento del ADN.
α hélice Estructura secundaria enrollada de una cadena polipeptídica formada por uniones de hidrógeno entre aminoácidos separados por cuatro residuos.
hélice-giro-hélice Dominio de unión al ADN de un factor de transcripción en el que tres o cuatro regiones en hélice contactan con el ADN.
hélice-lazo-hélice Dominio de unión a ADN de un factor de transcripción formado por la dimerización de dos cadenas polipeptídicas. Los dominios de dimerización de estas proteínas consisten en dos regiones en hélice separadas por un lazo.
hemicelulosa Polisacárido que entrelaza microfibrillas de celulosa en las paredes celulares vegetales.
hemidesmosoma Región de contacto entre células y la matriz extracelular donde los filamentos de queratina se unen a la integrina.
hendidura revestida de clatrina Región especializada de la superficie de las membranas celulares que contiene receptores para macromoléculas que deben internalizarse por mitosis.
herencia epigenética La transmisión de información que no se encuentra en la secuencia del ADN.
herpesvirus Miembro de una familia de virus de ADN, algunos de cuyos miembros inducen cáncer.
herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi Herpesvirus humano que causa el sarcoma de Kaposi.
heterocromatina Cromatina condensada y transcripcionalmente inactiva.
hibridación de los ácidos nucleicos Formación de moléculas de doble hebra de ADN y/o ARN por apareamiento de bases complementarias.
hibridación fluorescente *in situ* (FISH) Método empleado para localizar genes en los cromosomas, empleando sondas fluorescentes.
hibridación *in situ* Uso de sondas radioactivas o fluorescentes para detectar secuencias de ARN o ADN en extractos celulares, cromosomas o células intactas.
hidrofílico Soluble en agua.
hidrofóbico No soluble en agua.
hipermutación somática La introducción de múltiples mutaciones en las regiones variables de inmunoglobulina reordenadas para incrementar la diversidad de los anticuerpos.
hipótesis SNARE Hipótesis de que la fusión vesicular está mediada por pares de proteínas transmembrana (SNARE) en las membranas vesicular y diana.

hipótesis un gen-una enzima Este hipótesis, que se sustenta en el análisis de los mutantes nutricionales de Neurospora realizados en la década de 1940, sostiene que un gen codifica la estructura de una única enzima. En la actualidad, se cree que un gen especifica la estructura de una sola cadena polipeptídica.

histona Miembro de una familia de proteínas que empaquetan en ADN en los cromosomas de las células eucarióticas.

hoja β Estructura secundaria en forma de lámina de una cadena polipeptídica, formada por enlaces de hidrógeno entre aminoácidos localizados en diferentes regiones del polipéptido.

homeobox (caja homeótica) Secuencias de ADN conservadas de 180 pares de bases que codifican los homeodominios.

homeodominio Tipo de dominio, de unión al ADN, que se encuentra en los factores de transcripción que regulan la expresión génica durante el desarrollo embrionario.

hormona esteroidea Miembro de un grupo de hormonas hidrofóbicas, como estrógeno y testosterona, que provienen del colesterol.

hormona peptídica Molécula señalizadora compuesta por aminoácidos.

hormona tiroidea Hormona sintetizada a partir de la tirosina en la glándula tiroides.

hormona Molécula de señalización producidas por las glándulas endocrinas que actúan sobre células en lugares distantes del cuerpo.

hormonas vegetales Miembro de un grupo de pequeñas moléculas que coordinan las respuestas de los tejidos vegetales a las señales medioambientales.

horquilla de replicación Región de la síntesis del ADN donde las hebras parentales se separan y crecen dos nuevas hebras hijas.

huso mitótico Formación de microtúbulos que se extienden desde los polos del huso y que es responsable de la separación de los cromosomas hermanos durante la mitosis. Véase también microtúbulos cinetocóricos, microtúbulos polares y microtúbulos astrales.

IAP Inhibidor de la apoptosis. Miembro de una familia de proteínas que inhiben la apoptosis mediante la interacción con caspasas.

IκB Una subunidad inhibidora de los factores de transcripción NF-κB.

importina Receptor proteico que reconoce señales de localización nuclear y dirige la importación nuclear.

impronta genómica Regulación de los genes cuya expresión depende de si han sido heredados por parte de la madre o del padre, aparentemente regulada por la metilación del ADN.

inactivación del cromosoma X Mecanismo de compensación de la dosis en el que la mayoría de los genes de uno de los cromosomas X se inactivan en las células femeninas.

inestabilidad dinámica Alternación de los microtúbulos entre ciclos de crecimiento y degradación.

inhibición de contacto Inhibición del movimiento o de la proliferación de células normales como resultado de un contacto célula-célula.

inhibición dependiente de la densidad Cese de la proliferación de células normales en cultivo a una determinada densidad celular.

inhibición por retroalimentación Tipo de regulación alostérica en donde el producto de una ruta metabólica inhibe la actividad de una enzima implicada en su síntesis.

inhibidor de Cdk (CKI) Miembro de una familia de proteínas que fijan Cdk e inhiben su actividad.

iniciación tumoral Primer paso en el desarrollo de un tumor, resultante de la proliferación anormal de una sola célula.

inmunoglobulina Véase anticuerpo.

inmunoprecipitación Empleo de anticuerpos para aislar proteínas.

inmunoprecipitación de cromatina Un método para la determinación de las regiones del ADN que se unen a factores de transcripción en el interior celular.

inmunotinción Método que emplea anticuerpos para detectar proteínas que han sido separadas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) Segundo mensajero, formado por la hidrólisis de PIP_2, que señala la liberación de iones de calcio desde el retículo endoplasmático.

integrina Proteína transmembrana que interviene en la adhesión de las células a la matriz extracelular.

interacción heterofílica Interacción entre dos tipos diferentes de moléculas de adhesión celular.

interacción homofílica Interacción entre moléculas de adhesión celular del mismo tipo.

intercambio rotatorio Comportamiento dinámico de los filamentos de actina y los microtúbulos, en el que la pérdida de subunidades en un extremo del filamento se equilibra por su adición en el otro extremo.

interfase Período del ciclo celular entre dos mitosis que incluye las fases G_1, S, y G_2.

interferencia de ARN (ARNi) Degradación del ARNm por moléculas de ARN cortas, de doble hebra y homólogas.

intrón Secuencia no codificante que interrumpe los exones en un gen.

Jun Factor de transcripción, codificado por un protooncogén, que es activado en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.

kilobase (kb) Mil nucleótidos o pares de bases de nucleótidos.

knockout Inactivación de un gen cromosómico mediante recombinación homóloga con un alelo mutante clonado.

lamela media Región de la pared celular vegetal que actúa como pegamento para mantener unidas las células adyacentes.

lamelipodio Amplia extensión de la membrana plasmática, formada a partir de actina, que está implicada en el movimiento de los fibroblastos.

lámina Proteína de los filamentos intermedios que forman la lámina nuclear.

lámina basal Matriz extracelular en forma de lámina que soporta las células epiteliales y rodea las células musculares, células adiposas y nervios periféricos.

lámina nuclear Malla de filamentos laminares que proporciona un soporte estructural al núcleo.

laminina Principal proteína de adhesión de la lámina basal.

lazo de retroalimentación Un mecanismo de regulación en el que un elemento corriente abajo de una vía de señalización controla la actividad de un componente corriente arriba de la misma vía.

leptoteno Estadio inicial de la larga profase de la meiosis I durante la cual los cromosomas homólogos se emparejan después de la condensación.

leucemia Cáncer que aparece en los precursores de las células sanguíneas circulantes.

leucoplasto Plástido que almacena fuentes de energía en tejidos vegetales no fotosintéticos.

levaduras Los eucariotas unicelulares más simples. Las levaduras son modelos importantes para los estudios de las células eucariotas.

ligando Molécula que se une a un receptor.

lignina Polímero de restos fenólicos que fortalece las paredes celulares secundarias.

LINE (long interspersed elements) Familia de retrotransposones altamente repetidos en el genoma de los mamíferos.

linaje celular Células que pueden proliferar indefinidamente en cultivo.

linfocito Célula sanguínea que actúa en la respuesta inmunitaria. Los linfocitos B producen anticuerpos y los linfocitos T son responsables de la inmunidad mediada por células.
linfoma Cáncer de células linfoides.
lípido Miembro de un grupo de moléculas hidrofóbicas que funciona como depósito de energía, como señalización molecular y como componente principal de la membrana celular.
lipoproteína de baja densidad (LDL) Partícula de lipoproteína que transporta colesterol en la circulación.
liposoma Vesícula lipídica empleada para introducir ADN en las células de mamífero.
lisosoma Orgánulo citoplasmático que contiene enzimas que destruyen polímeros biológicos.

macrófago Clase de glóbulo blanco sanguíneo especializado en la fagocitosis.
macropinocitosis Ingesta de fluidos en grandes vesículas.
manosa-6-fosfato Residuo modificado de manosa que dirige las proteínas hacia los lisosomas.
MAP quinasas Familia de proteína-serina/treonina quinasas activadas por mitógeno que son reguladores ubicuos del crecimiento y diferenciación celular.
mapa de restricción Localización de los sitios de corte de la endonucleasa de restricción en una molécula de ADN.
marco de lectura abierto Secuencia de nucleótidos que no contiene codones de detención y puede codificar un polipéptido.
material pericentriolar Material en el centrosoma que inicia el ensamblaje de los microtúbulos.
matriz Espacio interno mitocondrial.
matriz extracelular Proteínas y polisacáridos secretados que rellenan los espacios entre las células y que une las células y los tejidos entre sí.
mediador Complejo de proteínas que estimula la transcripción de los genes codificadores de proteínas y les permite responder a los factores reguladores gen-específicos.
megabase (Mb) Un millón de nucleótidos o de pares de bases de nucleótidos.
meiosis División de células diploides en una progenie haploide, consistente en dos rondas secuenciales de división nuclear y celular.
MEK (MAP quinasa/ERK quinasa) Proteína de especificidad dual que fosforila y activa a miembros de la familia ERK de MAP quinasas.
membrana de basamento Véase lámina basal.
membrana nuclear Una de las membranas que forma la envuelta nuclear; la membrana nuclear externa continúa por el retículo endoplasmático y la membrana nuclear interna es adyacente a la lámina nuclear.
membrana plasmática Bicapa fosfolipídica con proteínas asociadas que rodea la célula.
membrana del tilacoide Membrana más interna de los cloroplastos y que es el sitio donde tiene lugar el transporte electrónico y la síntesis de ATP.
mesodermo Capa media germinal; da lugar a los tejidos conectivos y al sistema hematopoyético.
metabolismo oxidativo Empleo del oxígeno molecular como aceptor de electrones en la degradación de moléculas orgánicas.
metafase Fase de la mitosis durante la cual los cromosomas se alinean en la placa metafásica en el centro de la célula.
metástasis Propagación de las células cancerígenas desde la sangre o el sistema linfático a otros lugares del organismo.
microARN (miARN) Un ARN corto no codificante que se produce de forma natural y actúa para regular la expresión génica.
***microarray* de ADN** Portaobjetos de cristal o un filtro sobre el que se imprimen oligonucleótidos o fragmentos de ADNc con una elevada densidad, permitiendo el análisis simultáneo de miles de genes mediante hibridación del *microarray* con sondas fluorescentes.
microfibrillas de celulosa Fibra de las paredes celulares vegetales que se forman por la asociación de varias docenas de cadenas paralelas de celulosa.
microfilamento Filamento citoesquelético compuesto de actina.
microscopia confocal Forma de microscopia en la que se combina la microscopia de fluorescencia con el análisis electrónico de la imagen para obtener imágenes con un contraste y detalle elevados.
microscopia de campo claro Forma más sencilla de microscopia lumínica, en la que la luz pasa directamente a través de una célula.
microscopia de contraste de fases Tipo de microscopia en el que las variaciones en la densidad o el grosor entre partes de la célula se convierten en diferencias de contraste en la imagen final.
microscopia de contraste por interferencia diferencial Tipo de microscopia en el que las variaciones de la densidad o el grosor entre partes de la célula se convierten en diferencias de contraste en la imagen final.
microscopia de excitación multifotónica Forma de microscopia de fluorescencia en la que la muestra es iluminada con una luz de longitud de onda tal que la excitación del colorante fluorescente requiere de la absorción simultánea de dos o más fotones.
microscopia de fluorescencia Tipo de microscopia en el que las moléculas son detectadas en base a la emisión de luz fluorescente.
microscopia electrónica Tipo de microscopia que emplea un rayo de electrones para formar una imagen. En la microscopia electrónica de transmisión, un rayo de electrones pasa a través de una muestra marcada con metales pesados. En la microscopia electrónica de barrido, los electrones dispersados por la superficie de la muestra se analizan para generar una imagen tridimensional.
microscopia electrónica de barrido Véase microscropia electrónica.
microscopia electrónica de transmisión Véase microscopia electrónica.
microscopia favorecida por vídeo Uso combinado de cámaras de vídeo con microscopia lumínica para permitir la visualización de objetos pequeños.
micropúa Véase filopodio.
microsoma Pequeña vesícula formada por el retículo endoplásmico cuando las células se rompen.
microtúbulo Componente citoesquelético formado por la polimerización de la tubulina dando lugar a segmentos rígidos y huecos de aproximadamente 25 nm de diámetro.
microtúbulo astral Microtúbulo del huso mitótico que se extienden a la periferia celular.
microtúbulo cinetocórico Microtúbulo del huso mitótico que fijan los cromosomas condensados a sus centrómeros.
microtúbulo polar Un miembro de una clase de microtúbulos del huso mitótico que se solapan en el centro de la célula y que empujan a los polos del huso para separarlos.
microtúbulos cromosómicos Los microtúbulos del huso mitótico que se unen a los extremos de los cromosomas condensados.
microvellosidad Extensión de la membrana plasmática, basada en la actina, abundante en las superficies de las células implicadas en la absorción.
mineralocorticoides Hormona esteroidea producidas por la glándula adrenal que actúan sobre el riñón para regular el equilibrio de sales y agua.
miofibrilla Haz de filamentos de actina y miosina en las células musculares.
miosina Proteína que interacciona con la actina como motor molecular.
miosina I Tipo de miosina que actúa para transportar mercancías a lo largo de los filamentos de actina.

miosina II Tipo de miosina que produce la contracción mediante el deslizamiento de filamentos de actina.

mitocondria Orgánulo citoplasmático responsable de la síntesis de la mayoría del ATP de las células eucariotas mediante fosforilación oxidativa.

mitosis División nuclear.

modelo de cerradura y llave Modelo de acción enzimática en el que el sustrato encaja con precisión en el centro activo de la enzima.

modelo de mosaico fluido Modelo de estructura de la membrana donde las proteínas se insertan en una bicapa fluida fosfolipídica.

modelo del filamento deslizante Modelo de contracción muscular en el que la contracción resulta del deslizamiento de los filamentos de actina y miosina, uno respecto del otro.

modelo Holliday Un modelo molecular de recombinación genética que implica la formación de regiones heterodúplex.

moléculas de adhesión celular Proteínas transmembrana que intervienen en las interacciones célula-célula.

molécula recombinante Fragmento de ADN unido a un vector.

monocistrónico ARN mensajero que codifica una única cadena polipeptídica.

monolito Tipo de célula sanguínea implicada en las reacciones inflamatorias.

monosacáridos Azúcar sencillo con la fórmula básica de $(CH_2O)_n$.

Mos Proteína quinasa necesaria para la progresión desde la meiosis I hasta la meiosis II y el mantenimiento de la detención en metafase II en los oocitos de vertebrados.

motor molecular Proteína que genera fuerza y movimiento mediante la conversión de energía química en energía mecánica.

mTOR Una proteína quinasa implicada en la regulación de la síntesis proteica en respuesta a factores de crecimiento, nutrientes y disponibilidad de energía.

muerte celular programada Forma fisiológica normal de muerte celular caracterizada por la apoptosis.

mundo ARN Estadio temprano de la evolución basado en moléculas autorreplicantes de ARN.

mutación Alteración genética.

mutagénesis *in vitro* Introducción de mutaciones en un ADN clonado *in vitro*.

mutágeno Producto químico que induce una alta frecuencia de mutaciones.

mutante inhibidor dominante Mutante que interfiere con la función del alelo normal del gen.

mutante sensible a temperatura Célula que expresa una proteína que es funcional a una temperatura pero no a otra, mientras que la proteína normal es funcional a ambas temperaturas.

NADP reductasa Enzima que transfiere electrones de la ferrodoxina al $NADP^+$, dando NADPH.

nebulina Proteína que regula la longitud de los filamentos de actina en las células musculares.

necrosis Muerte accidental de células que da lugar a una lesión aguda.

nectina Una molécula de adhesión celular implicada en la formación de uniones adherentes.

neurofilamento Clase de filamento intermedio que sostiene los axones de las células nerviosas.

neurohormona Péptidos que son secretados por las neuronas y que actúan sobre células distantes.

neurona Célula nerviosa especializada en recibir y transmitir señales por todo el cuerpo.

neuropéptido Molécula peptídica de señalización secretada por las neuronas.

neurotransmisor Pequeña molécula hidrofílica que transporta una señal desde una neurona estimulada a una célula diana en una sinapsis.

neurotrofina Miembro de una familia de polipéptidos que regula el desarrollo y supervivencia neuronal.

nexina Proteína que une dobletes de microtúbulos entre sí en el axonema.

NF-κB Una familia de factores de transcripción que se activan en respuesta a una diversidad de estímulos.

nicho Microambiente que mantiene a las células madre en los tejidos.

nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD^+) Coenzima que actúa como transportador electrónico en reacciones de oxidación/reducción.

nidogén Véase entactina.

N-miristoilación Adición de ácido mirístico (un ácido graso de 14 carbonos) al resto de glicina N-terminal de una cadena polipeptídica.

N-*myc* Protooncogén que codifica un factor de transcripción y es activado con frecuencia por la amplificación de neuroblastomas.

nitrosilación La modificación proteica mediante la adición de grupos NO a las cadenas laterales de los residuos de cisteína.

Notch Receptor transmembrana de una vía de señalización que regula el destino celular como consecuencia de interacciones intercelulares durante el desarrollo.

núcleo Orgánulo más prominente de las células eucariotas; contiene el material genético.

nucléolo Sitio nuclear de transcripción y procesamiento del ARNr, y ensamblaje de los ribosomas.

nucleósido Base de purina o pirimidina unida a un azúcar (ribosa o desoxirribosa).

nucleosoma Unidad básica estructural de cromatina que consiste en ADN enrollado alrededor de un núcleo de histona.

nucleótido Nucleósido fosforilado.

oligonucleótido Polímero corto de sólo unos pocos nucleótidos.

oligosacárido Polímero corto de sólo unos pocos azúcares.

oncogén Gen capaz de inducir una o más características de las células cancerígenas.

operador Secuencia reguladora de ADN que controla la transcripción de un operón.

operón Grupo de genes adyacentes transcritos como un único ARNm.

organizador celular activado por fluorescencia Instrumento que organiza las células individuales en base a su intensidad de fluorescencia.

origen de replicación Secuencia específica de ADN que actúa como sitio de unión para las proteínas que inician la replicación.

p53 Factor de transcripción (codificado por el gen supresor de tumores p53) que detiene el ciclo celular en G_1 en respuesta a un ADN dañado y que se requiere para la apoptosis inducida por diferentes estímulos.

palmitoilación Adición de ácido palmítico (un ácido graso de 16 carbonos) a restos de cisteína de una cadena polipeptídica.

papilomavirus Miembro de la familia de virus de ADN, algunos de los cuales causan cáncer cervical y otros cánceres anogenitales en el hombre.

paquiteno Estadio de meiosis I durante el cual tiene lugar la recombinación entre los cromosomas homólogos.

pared celular Estructura rígida y porosa que forma una capa externa y proporciona soporte estructural a bacterias, hongos y células vegetales.

pared celular secundaria Pared celular gruesa que se encuentra entre la membrana plasmática y la pared celular primaria de las células vegetales que han cesado su crecimiento.

paredes celulares primarias Paredes de células vegetales en crecimiento.

partícula de reconocimiento de la señal (SRP) Partícula compuesta de proteínas y de ARN 7SL que se une a las secuencias

de señalización y dirige las cadenas polipeptídicas al retículo endoplásmico.

partículas de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPsn) Complejo de ARNsn con proteínas.

partículas del centro del nucleosoma Partículas que contienen 146 pares de bases de ADN asociados en torno a un núcleo de histonas.

peptidasa de señalización Enzima que retira la secuencia de señalización de una cadena polipeptídica por proteólisis.

peptidasa procesadora de la matriz (MPP) Proteasa que escinde presecuencias de las proteínas internalizadas en la matriz mitocondrial.

peptidasa procesadora estromal (SPP) Proteasa que escinde a los péptidos de tránsito de las proteínas internalizadas en el estroma del cloroplasto.

péptido de transición Secuencia N-terminal que dirigen a las proteínas para su internalización en el cloroplasto.

pectina Polisacárido formador de geles de las paredes celulares vegetales.

peptidil prolil isomerasa Enzima que facilita el pliegue de las proteínas mediante la catalización de la isomerización *cis-trans* de los enlaces prolil peptídicos.

peptidoglicano Componente principal de las paredes celulares bacterianas constituido por cadenas polisacáridas lineales entrelazadas mediante péptidos cortos.

peroxina Una proteína presente en los peroxisomas.

peroxisoma Orgánulo citoplasmático especializado en llevar a cabo reacciones oxidativas.

pez cebra Especie de pez pequeño empleado para estudios genéticos del desarrollo de los vertebrados.

pigmento fotosintético Molécula que capturan la energía de los rayos solares absorbiendo fotones.

pinocitosis Entrada de fluidos o moléculas al interior de una célula mediante vesículas pequeñas.

pirimidina Uno de los tipos de bases presentes en los ácidos nucleicos. Las pirimidinas son citosina, timidina y uracilo.

placa celular Estructura discoide rodeada por membrana que forma nuevas paredes celulares durante la citocinesis de las plantas superiores.

plaquina Miembro de una familia de proteínas que asocia los filamentos intermedios con otras estructuras celulares.

plasmalógenos Familia de fosfolípidos que tienen enlace éter y enlace éster.

plásmido Molécula pequeña de ADN circular capaz de replicarse de forma independiente en una célula hospedadora.

plásmido Ti Plásmido empleado para la transferencia génica en plantas.

plasmodesmo Conexión citoplasmática entre células vegetales adyacentes que está formada por una región continua de membrana plasmática.

plastos Miembro de una familia de orgánulos vegetales que incluye a los cloroplastos, cromoplastos, leucoplastos, amiloplastos y elaioplastos.

PML/RARα Oncogén formado por la translocación del receptor del ácido retinoico en la leucemia aguda promielocítica.

poliadenilación proceso de adición de una cola de poli-A a un pre-ARNm.

policistrónico ARN mensajero que codifica múltiples cadenas polipeptídicas.

polinucleótido Polímero que contiene millones de nucleótidos.

poliomavirus Virus de ADN tumoral ampliamente estudiado.

polipéptido Polímero de aminoácidos.

pólipo Tumor benigno que se extiende por una superficie epitelial.

polisacárido Polímero que contiene cientos o miles de azúcares.

polisoma Serie de ribosomas que traducen un ARN mensajero.

porina Miembro de una clase de proteínas que atraviesan las membranas como barriles-β y forman canales en las membranas externas de algunas bacterias, mitocondrias y cloroplastos.

potenciador (Referido a «enhancer», «secuencia activadora» o «secuencia intensificadora».) Secuencia reguladora de la transcripción que puede localizarse en un sitio distante del promotor.

potencial de acción Impulsos nerviosos que viajan a lo largo de los axones.

pre-ARNm Transcritos primarios que se procesan para formar ARN mensajeros en las células eucariotas.

pre-ARNr Transcritos primarios que se cortan para dar lugar a ARN ribosómicos individuales (los ARNr 28S, 18S y 5,8S de las células eucariotas).

pre-ARNt Transcritos primarios que se cortan para formar ARN de transferencia.

prenilación Adición de tipos específicos de lípidos (grupos prenilo) a restos de cisteína C-terminales de una cadena polipeptídica.

presión de turgencia Presión interna hidrostática en el interior de las células vegetales.

presecuencia Secuencia aminoterminal que dirige las proteínas hacia las mitocondrias.

primasa ARN polimerasa usada para iniciar la síntesis de ADN.

procolágeno Precursor soluble de los colágenos formadores de fibrillas.

producto Compuesto formado como resultado de una reacción enzimática.

profase Fase inicial de la mitosis, marcada por la aparición de los cromosomas condensados y el desarrollo del huso mitótico.

profilina Proteína de unión a la actina que estimula el ensamblaje de monómeros de actina en filamentos.

progesterona Hormona esteroidea producida por los ovarios.

progresión tumoral Acumulación de mutaciones en el interior de células de una población tumoral, resultando en un crecimiento acelerado y malignidad.

prometafase Período de transición entre la profase y la metafase durante la cual los microtúbulos del huso mitótico se unen a los cinetocoros y los cromosomas se mueven de un lado a otro hasta que son alineados en el centro de la célula.

promotor Secuencia de ADN donde se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

promotor tumoral Compuesto que conduce al desarrollo tumoral mediante la estimulación de la proliferación celular.

pronúcleo Uno de los dos núcleos haploides de un ovocito recién fecundado.

proplástido Orgánulo no diferenciado de pequeño tamaño que puede transformarse en distintos tipos de plástidos maduros.

prostaciclina Eicosanoide formado a partir de la prostaglandina H_2.

prostaglandina Familia de lípidos eicosanoides implicados en la señalización de la inflamación.

proteína Polipéptido con una secuencia aminoacídica exclusiva.

proteína activadora de la GTPasa Proteína que estimula la hidrólisis de GTP por parte de las proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP.

proteína asociadas a los microtúbulos (MAP) Proteína que se une a los microtúbulos y modifica su estabilidad.

proteína de fijación a TATA (TBP) Factor de transcripción basal que se une de forma directa a la caja TATA.

proteína de fluorescencia verde (GFP) Proteína de medusa que se emplea comúnmente como marcador en la microscopia de fluorescencia.

proteína de transferencia de fosfolípidos Proteína que transporta moléculas fosfolipídicas entre membranas celulares.

proteína de unión a la actina Proteína que se entrecruza a la actina y regula el ensamblaje, desensamblaje y organización de filamentos de actina.

proteína de unión al ADN de hebra sencilla Proteína que estabiliza el ADN desenrollado uniéndose a las regiones de hebra sencilla.

proteína disulfuro isomerasa Enzima que cataliza la formación y rotura de los puentes disulfuro (S-S).

proteína fosfatasa Enzima que revierte la acción de las proteínas quinasas mediante la retirada de los grupos fosfatos desde restos de aminoácidos fosforilados.
proteína-G Familia de proteínas de señalización celular reguladas por la unión del nucleótido guanina.
proteína G heterotrimérica Proteína de unión a nucleótidos de guanina que consiste en tres subunidades.
proteína HMG Miembro de una familia de proteínas cromosómicas no histónicas que influye en la arquitectura de la cromatina.
proteína integral de membrana Proteína embebida en el interior de la bicapa lipídica de las membranas celulares.
proteína periféricas de membrana Proteína indirectamente asociadas con las membranas celulares mediante interacciones proteína-proteína.
proteína quinasa Enzima que fosforila proteínas mediante la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP.
proteína quinasa A Proteína quinasa regulada por el AMP cíclico.
proteína quinasa AMPc-dependiente Véase proteína quinasa A.
proteína quinasa C miembro de una familia de proteína-serina/treonina quinasas que se activan con diacilglicerol y Ca^{2+} y actúan en la transducción intracelular de señales.
proteína *scaffold* Proteína que se unen a componentes de las vías de señalización, dando lugar a su organización en complejos señalizadores específicos.
proteína-serina/treonina quinasa Proteína quinasa que fosforila restos de serina y treonina.
proteína STAT Miembro de una familia de factores de transcripción que tienen un dominio SH2 y que son activadas por la fosforilación de la tirosina, que promueve su translocación desde el citoplasma al núcleo.
proteína-tirosina fosfatasa Enzima que retira los grupos fosfato desde restos de fosfotirosina.
proteína-tirosina quinasa Proteína quinasa que fosforila restos de tirosina.
proteína-tirosina quinasa no receptora Proteína tirosina quinasa intracelular.
Proteína tirosina quinasa transmembrana Proteína-tirosina quinasa asociada a la membrana que es receptora de ligandos extracelulares.
proteína transmembrana Proteína integrales de membrana que se extienden por la bicapa lipídica y que presentan porciones expuestas a ambos lados de la membrana.
proteína transportadora Proteína que se une selectivamente fijan y transportan pequeñas moléculas a través de una membrana.
proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP Gran familia de proteínas monoméricas de unión a GTP, incluyendo las proteínas Ras, Rab, Rho y Ran.
proteínas de canal Proteína que forman poros a través de una membrana.
proteínas de choque térmico Miembro altamente conservado de proteínas chaperona que se expresan en células expuestas a elevadas temperaturas o a otras formas de estrés medioambiental.
proteínas del neurofilamento (NF) Miembro de una familia de proteínas de los filamentos intermedios de diversos tipos de células nerviosas maduras.
proteínas ERM Familia de proteínas que asocian los filamentos de actina a la membrana plasmática de diversos tipos de células.
proteínas HMGN Proteínas no histónicas cromosómicas asociadas con la cromatina descondensada, transcripcionalmente activa.
proteoglicano Proteína que se une a los glicosaminoglicanos.
proteoma Todas las proteínas expresadas en una célula determinada.
proteómica Análisis a gran escala de las proteínas celulares.
proteosoma Gran complejo constituido por proteasas que degrada las proteínas marcadas por la ubiquitina.
proto-oncogén Gen celular normal que puede convertirse en un oncogén.
prueba de asociación de todo el genoma Método de análisis genómico a gran escala empleado para identificar genes responsables de trastornos hereditarios.
pseudogén Copia no funcional de un gen.
pseudogén procesado Pseudogén que surge de la transcripción inversa de ARNm.
pseudopodio Extensión de la membrana plasmática, constituida por actina, responsable de la fagocitosis y del movimiento ameboide.
PTEN Fosfatasa lipídica que defosforila PIP_3 y actúa como supresor de tumores.
de ensamblaje del huso Un del ciclo celular que monitoriza el alineamiento de los cromosomas sobre el huso metafásico.
punto de restricción Punto de regulación en ciclo de las células animales que sucede tardíamente en G_1. Después de este punto, la célula está destinada a entrar en S y a sufrir un ciclo de división celular.
Punto de control de daños al ADN Punto de control del ciclo celular que garantiza que el ADN dañado no se replicará ni se transmitirá a las células hijas.
puntos de control del ciclo celular Punto regulador que impiden la entrada en la siguiente fase del ciclo celular hasta que los eventos de la fase precedente se hayan completado.
purina Uno de los tipos de bases presentes en los ácidos nucleicos. Las purinas son adenina y guanina.

queratina Proteína de los filamentos intermedios de las células epiteliales.
queratina blanda Queratina encontradas en el citoplasma de las células epiteliales.
queratina dura Queratina empleada para la producción de estructuras como el pelo, uñas y cuernos.
quiasma Lugares de recombinación por los que se unen los cromosomas homólogos durante la meiosis.
quinasa de la cadena ligera de miosina Proteína quinasa que activa a la miosina II fosforilando su cadena ligera reguladora.
quinasa de (CHK1 y CHK2) Una proteína quinasa que orquesta la detención del ciclo celular en respuesta al ADN lesionado. CHK1 y CHK2 son activadas mediante las proteínas quinasas ATM y ATR.
quinasa Janus Familia de proteína-tirosina quinasas no receptoras asociadas a los receptores de citoquinas.
quinasa semejante a Polo Una proteína quinasa implicada en la formación del huso mitótico, la función cinetocórica y la citocinesis.
quinesina Proteína motora que migra a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo positivo.
quitina Polímero de restos de N-acetilglucosamina que es el principal componente de las paredes celulares fúngicas.

Rab Familia de proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP que juegan papeles clave en el transporte vesicular.
Rac Proteína de bajo peso molecular de unión a GTP implicada en la regulación del citoesqueleto de actina.
Rad51 Una proteína eucariótica que funciona de forma similar a RecA en la recombinación homóloga.
raf Gen que codifica las proteínas Raf.
Ran Pequeña proteína de unión a GTP implicada en la importación y exportación nuclear.
ras. Gen que codifica las proteínas Ras.
ratón transgénico Ratón que porta genes no propios incorporados a su línea germinal.
Rb Proteína reguladora de la transcripción codificada por un gen supresor de tumores que fue identificada a través del análisis genético de un retinoblastoma.

RE de transición Región del RE del que salen las proteínas hacia el aparato de Golgi.
reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Método para la amplificación de una región de ADN mediante repetidos ciclos de síntesis de ADN *in vitro*.
reacciones lumínicas Reacciones de la fotosíntesis en las que la energía solar dirige la síntesis de ATP y NADPH.
reacciones oscuras Serie de reacciones que convierte el dióxido de carbono y el agua en hidratos de carbono durante la fotosíntesis. Véase ciclo de Calvin.
RecA Proteína que estimula el intercambio de hebras entre moléculas homólogas de ADN durante la recombinación.
receptor acoplado a proteína-G Receptor caracterizado por siete α-hélices acopladas a la membrana. La unión del ligando provoca un cambio conformacional que activa una proteína-G.
receptor de célula T Proteína de superficie de un linfocito T que reconoce antígenos expresados en la superficie de otras células.
receptor de hormonas esteroideas Factor de transcripción que regula la expresión génica en respuesta a las hormonas esteroideas.
receptor de transporte nuclear Una proteína que reconoce las señales de localización nuclear y media el transporte a través de la envuelta nuclear.
receptor SRP Proteína de la membrana del retículo endoplásmico que une la partícula de reconocimiento de la señal (SRP).
Receptor tipo toll Miembro de una familia de receptores que reconoce diversas moléculas asociadas a bacterias y virus patógenos.
receptor de rianodina Tipo de canal de calcio en el músculo y células nerviosas que se abren en respuesta a cambios en el potencial de membrana.
recesivo Alelo enmascarado por un alelo dominante.
recombinación Intercambio de material genético.
recombinación de cambio de clase Un tipo de recombinación específica de región responsable de la asociación de regiones de inmunoglobulina V(D)J reordenadas con diferentes regiones pesadas constantes.
recombinación específica de sitio Recombinación mediada por proteínas que reconocen secuencias específicas de ADN.
recombinación homóloga Recombinación entre segmentos de ADN con secuencias nucleotídicas homólogas.
recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueado (FRAP) Un método empleado para estudiar el movimiento de proteínas en el interior de células vivas.
red de actina Filamentos de actina que se entrecruzan en redes tridimensionales no densas.
red de señalización La red interconectada formada mediante interacciones de múltiples vías de señalización en el interior de una célula.
red del *cis* Golgi Región del aparato de Golgi en el que las proteínas entran desde el retículo endoplásmico.
red del *trans* Golgi Compartimento del Golgi en el que se organizan las proteínas y se empaquetan para salir del aparato de Golgi.
región no traducida 3′ Región no codificante en el extremo 3′ del ARNm.
región no traducida 5′ Región no codificante en el extremo 5′ del ARNm.
regulación alostérica Regulación de enzimas mediante moléculas pequeñas que se fijan a sitios diferentes del centro activo, cambiando la conformación y la actividad catalítica de la enzima.
regulación por disminución de receptores Pérdida de receptores de la superficie celular como resultado de su internalización por endocitosis después de la unión del ligando.
relaciones cruzadas Un mecanismo regulador en el que una vía de señalización controla la actividad de otra.
reparación acoplada a la transcripción Reparación preferente de daño en las hebras transcritas de ADN.
reparación de bases mal apareadas Sistema de reparación que retira las bases mal emparejadas de las nuevas hebras de ADN sintetizado.
reparación por escisión de base Mecanismo de reparación del ADN en el que una única base dañada es retirada de la molécula de ADN.
reparación por escisión de nucleótido Mecanismo de reparación del ADN donde los oligonucleótidos que contienen bases dañadas se retiran de la molécula del ADN.
reparación propensa al error Forma de reparación en la que las ADN polimerasas especializadas replican a través de un sitio de ADN dañado.
reparación recombinatoria Reparación del ADN dañado mediante la recombinación con una molécula homóloga de ADN intacta.
repetición terminal larga (LTR) Secuencias de ADN encontradas en los extremos del ADN retroviral y de retrotransposones que son repeticiones directas de varios cientos de nucleótidos y se deben a la actividad de la transcriptasa inversa.
repeticiones de secuencia sencilla Miembro de una clase de secuencias repetidas de ADN que consisten en organizaciones en tandem de miles de copias de secuencias cortas.
replicación semiconservativa Proceso de replicación del ADN en el que dos hebras parentales se separan y sirven como moldes para la síntesis de nuevas hebras progenie.
represor Molécula reguladora que bloquea la transcripción.
resolución Capacidad de un microscopio de distinguir objetos separados por pequeñas distancias.
respuesta a proteínas no plegadas Una respuesta de estrés celular en el que un exceso de proteínas no plegadas en el retículo endoplásmico desencadena la inhibición general de la síntesis proteica, la expresión incrementada de chaperonas, y un incremento de la actividad del proteasoma.
retículo endoplasmático (ER) Red extensa de túbulos y sacos rodeados de membrana, implicados en la clasificación y en el procesamiento de las proteínas así como en la síntesis lipídica.
retículo endoplasmático liso Sitio principal de síntesis lipídica en las células eucariotas.
retículo endoplasmático rugoso Región del retículo endoplasmático cubierta de ribosomas e implicada en el metabolismo proteico.
retículo sarcoplásmico Red especializada de membranas de las células musculares que almacena una alta concentración de Ca^{2+}.
retinoide Molécula relacionada con el ácido retinoico.
retroposón Elemento transponible que se desplaza mediante la transcripción inversa de un intermediario de ARN.
retrovirus Virus que se replica haciendo una copia de ADN de su genoma de ARN mediante transcripción inversa.
Rho Familia de proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP implicadas en la regulación del citoesqueleto.
ribosa Azúcar de cinco átomos de carbono presente en el ARN.
ribosoma Partícula que se compone por ARN y proteínas y que son los sitios de síntesis proteica.
ribozima Enzima ARN.
RNasa H Enzima que degrada la hebra de ARN de las moléculas híbridas ARN-ADN.
RNasa P Ribozima que corta el extremo 5′ de un pre-ARNt.
rodopsina Fotorreceptor acoplado a proteína G en los bastones de la retina que activa la transducina en respuesta a la absorción lumínica.
rotura de doble hebra Daño que produce roturas en ambas hebras complementarias del ADN.

Saccharomyces cerevisiae Levadura que se reproduce por gemación frecuentemente estudiada.
sarcoma Cáncer de células de tejido conectivo.

sarcómero Unidad contráctil de las células musculares constituido por filamentos de actina y miosina que interaccionan entre sí.
secuencia de señalización *Secuencia hidrofóbica en el extremo* amino de una cadena polipeptídica que la marca en las bacterias para ser secretada o, en las células eucariotas, para que se incorpore al retículo endoplasmático.
secuencia espaciadora Secuencia de ADN presentes entre los genes.
secuencia replicante de forma autónoma (ARS) Origen de replicación de ADN en levaduras.
secuencia Shine-Dalgarno Secuencia anterior al sitio de iniciación que alinea los ARN bacterianos de forma correcta en los ribosomas.
segundo mensajero Compuesto cuyo metabolismo se ve modificado como resultado de una interacción ligando-receptor; actúa como un transductor de señal regulando otros procesos intracelulares.
selectinas Tipo de células de adhesión celular que reconocen oligosacáridos expuestos en la superficie de la célula.
señal de exportación nuclear Secuencia aminoacídica que marca las proteínas para transportarlas desde el núcleo al citosol.
señal de localización nuclear *Secuencia aminoacídica que mar*ca las proteínas para transportarlas desde el citoplasma al núcleo.
señalización autocrina Tipo de señalización celular en la que una célula produce un factor de crecimiento al cual también ella responde.
señalización endocrina Tipo de señalización célula-célula donde células endocrinas segregan hormonas que son llevadas por la circulación a células diana lejanas.
señalización paracrina Señalización célula-célula local donde una molécula liberada por una célula actúa sobre la célula diana vecina.
simporte Transporte de dos moléculas en la misma dirección a través de una membrana.
sinapsis Unión entre una neurona y otra célula, a través de la cual se transmite la información mediante neurotransmisores.
sinapsis Asociación de cromosomas homólogos durante la meiosis.
sinapsis eléctrica Ensamblaje especializado de uniones de tipo *gap que permiten el paso rápido de iones entre células ner*viosas.
SINE (*short interspersed elements*) Miembro de una familia de retrotransposones altamente repetidos en los genomas de los mamíferos.
síntesis de ADN translesión Una forma de reparación en los que ADN polimerasas especializadas replican a través de un sitio lesionado del ADN.
Smad Una familia de factores de transcripción activada mediante receptores de TGF-β.
SNARE Proteína transmembrana que interviene en la fusión de vesículas con las membranas diana.
sombreado metálico Técnica de microscopia electrónica en la que la superficie de una muestra se cubre con una fina capa de metal evaporado.
***splicing* alternativo** Generación de diferentes ARNm mediante variación del modelo de *splicing* del pre-ARNm.
***splicing* de ARN** Unión de exones en una molécula precursora de ARN.
src Gen que codifica la proteína Src.
Src Proteína-tirosina quinasa no receptora codificada por el oncogén (*src*) del virus del sarcoma de Rous.
START Punto regulador en el ciclo celular de levaduras que sucede al final de G_1. Después de este punto, la célula está determinada a entrar en S y sufrir un ciclo de división celular.
superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) Familia de moléculas de adhesión celular que contiene dominios estructurales similares a las inmunoglobulinas.
superfamilia de los receptores de citoquinas Familia de receptores de la superficie celular que actúan estimulando la actividad de proteína quinasas intracelulares.
superfamilia de los receptores nucleares *Familia de factores de* transcripción que incluye a los receptores de hormonas esteroídicas, la hormona tiroidea, el ácido retinoico y la vitamina D_3.
sustrato Molécula sobre la que actúa una enzima.
talina Proteína que media la asociación de filamentos de actina con integrinas en las adhesiones focales.
taxol Fármaco que se une a los microtúbulos y los estabiliza.
técnica *patch clamp* Método empleado para aislar y estudiar la actividad de canales iónicos aislados.
telofase Fase final de la mitosis, en la que se vuelve a formar el núcleo y se descondensan los cromosomas.
telomerasa Transcriptasa inversa que sintetiza secuencias repetidas teloméricas en los extremos de los cromosomas a partir de su propio molde de ARN.
telómero Repetición de secuencias sencillas de ADN que mantienen los extremos de los cromosomas lineales.
testosterona Hormona esteroidea producida por los testículos.
timina Pirimidina que se encuentra en el ADN emparejada con *adenina.*
titina Proteína grande que actúa como resorte para mantener a los filamentos de miosina centrados en el sarcómero muscular.
tomografía electrónica Un método empleado para generar imágenes tridimensionales mediante el análisis informático de múltiples imágenes bidimensionales obtenidas por microscopia electrónica.
topoisomerasa Enzima que cataliza la rotura reversible y reunificación de las hebras de ADN.
totipotencia Capacidad de dar lugar a cualquiera de los tres tipos de células de los tejidos y órganos adultos.
traducción Síntesis de una cadena polipeptídica a partir de un molde de ARNm.
traducción *in vitro* Síntesis proteica en un extracto libre de células.
transcitosis Clasificación y transporte de proteínas a diferentes dominios de la membrana plasmática después de una endocitosis.
transcripción *Síntesis de una molécula de ARN a partir de un* molde de ADN.
transcripción inversa ADN polimerasa que usa un molde de ARN.
transducción intracelular de señales Cadena de reacciones que transmiten señales químicas desde la superficie celular a sus objetivos intracelulares.
transducina Proteína G que estimula la GMPc fosforidesterasa, al ser activada por rodopsina.
transfección Introducción de un gen extraño en células eucariotas.
transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) Un método empleado para estudiar interacciones proteicas en el interior de células vivas.
transferencia génica Introducción de un ADN extraño en el interior de una célula.
transferencia Northern Método en el que los ARNm son separados mediante una electroforesis en gel y detectados por hibridación con sondas específicas.
transferencia nuclear de células somáticas *El procedimiento bá*sico de clonación animal en el que el núcleo de una célula somática adulta es transferido a un óvulo enucleado.
transferencia Southern Método en el que se emplean sondas radioactivas para detectar fragmentos específicos de ADN que han sido separados por electroforesis en gel.
transferencia Western Ver Inmunotinción.
transformación Transferencia de ADN entre bacterias genéticamente distintas. Véase también transformación celular.

transformación celular Conversión de células normales en células tumorales en cultivo.

translocón Canal de membrana a través del cual se transportan cadenas de polipéptidos al interior del retículo endoplásmico.

transportadores ABC Un miembro de la gran familia de proteínas de transporte de membrana caracterizadas por presentar un dominio de unión de ATP altamente conservado.

transporte activo Transporte de moléculas en una dirección energéticamente desfavorable, a través de la membrana, acoplado a la hidrólisis de ATP o a otra fuente de energía.

transporte pasivo Transporte de moléculas a través de la membrana en una dirección energéticamente favorable.

transposición Movimiento de las secuencias de ADN por todo el genoma.

transposón Secuencia de ADN que puede migrar a diferentes posiciones dentro del genoma.

transposón de ADN Elemento transponible que se mueven mediante intermediarios de ADN.

Trasplante de células madre hematopoyéticas Procedimiento clínico en el que se utiliza el trasplante de células madre hematopoyéticas como tratamiento del cáncer y enfermedades del sistema hematopoyético.

trasplante de médula ósea Un procedimiento clínico en el que el trasplante de células madre de la médula ósea se emplea en el tratamiento de cáncer y otras patologías del sistema hematopoyético.

triacilglicerol Tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol.

tromboxano Eicosanoide que participa en la coagulación sanguínea.

tropomiosina Proteína fibrosa que se une a los filamentos de actina y que regula la contracción mediante el bloqueo de la interacción entre actina y miosina.

troponina Complejo de proteínas que se une a los filamentos de actina y regula la contracción del músculo esquelético.

tubulina Proteína citoesquelética que polimeriza para formar microtúbulos.

tumor Cualquier proliferación anormal de las células.

tumor benigno Tumor que permanece confinado en su sitio de origen.

tumor maligno Tumor que invade un tejido normal y se extiende por todo el cuerpo.

twinfilina Una proteína de unión a la actina que estimula el ensamblaje de monómeros de actina en filamentos.

ubiquinona Véase coenzima Q.

ubiquitina Proteína altamente conservada que actúa como marcador para conducir a otras proteínas celulares a una rápida degradación.

ultracentrífuga Centrífuga que rota las muestras a altas velocidades.

unión adherente Región de adhesión célula-célula mediante la cual el citoesqueleto de actina se ancla a la membrana plasmática.

unión de tipo gap Canal de membrana plasmática que forma una conexión citoplasmática directa entre células adyacentes.

unión estrecha Red continua de hebras proteicas alrededor del perímetro de las células epiteliales, sellando el espacio entre las células y formando una barrera entre los dominios apical y basolateral.

unión Holliday Intermediario central en la recombinación, constituido por una estructura de hebras cruzadas formada por emparejamiento de bases homólogas entre las hebras de dos moléculas de ADN.

uniporte Transporte de una única molécula a través de una membrana.

uracilo Pirimidina que se encuentra en el ARN y que se empareja con adenina.

vacuola Gran saco rodeado por una membrana en el citoplasma de las células eucariotas. En las células vegetales, la función de las vacuolas es almacenar nutrientes y productos de desecho, degradar macromoléculas y mantener la presión de turgencia.

vector Molécula de ADN empleada para dirigir la replicación de un fragmento de ADN clonado en el interior de una célula hospedadora.

vector de expresión Vector empleado para dirigir la expresión de un fragmento de ADN clonado en una célula hospedadora.

vesícula del Golgi Compartimentos del aparato de Golgi en el que tienen lugar la mayoría de las actividades metabólicas.

vesícula revestida de clatrina Vesícula de transporte tapizada con clatrina.

vesícula revestida de COP Vesícula de transporte revestida de proteínas distintas de la clatrina (COP indica *coat protein*).

vesícula secretora Saco rodeado por una membrana que transportan proteínas desde el aparato de Golgi a la superficie celular.

vesícula sináptica Vesícula secretora que libera neurotransmisores a una sinapsis.

vía JAK/STAT Vía de señalización en la que los factores de transcripción STAT son activados como resultado de la fosforilación por miembros de la familia JAK de proteína quinasas.

vía secretora Movimiento de proteínas secretadas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, después, en el interior de vesículas secretoras, a la superficie celular.

villina Principal proteína formadora de haces de actina en las microvellosidades intestinales.

vimblastina Fármaco que inhibe la polimerización de los microtúbulos.

vimentina Proteína de los filamentos intermedios encontrada en una diversidad de tipos celulares.

vincristina Fármaco que inhibe la polimerización de los microtúbulos.

vinculina Proteína que media la asociación de filamentos de actina con integrinas en las adhesiones focales.

virus de Epstein-Barr Herpesvirus humano que causa los linfomas de células B.

virus de la hepatitis B Miembro de una familia de virus de ADN que infectan a las células del hígado y pueden desencadenar el desarrollo de cáncer hepático.

virus de la hepatitis C Miembro de una familia de virus de ARN que infectan células hepáticas y pueden desencadenar el desarrollo de cáncer hepático.

virus de los simios 40 (SV40) Virus tumoral de ADN ampliamente estudiado.

virus del sarcoma de Rous (RSV) Retrovirus altamente transformante, donde se identificó el primer oncogén.

virus tumoral Virus capaz de causar un cáncer en animales o humanos.

Wnt Molécula secretada de señalización que estimula una vía que regula el destino celular durante el desarrollo embrionario.

Xenopus laevis Rana africana empleada como sistema modelo en biología experimental.

zigoteno Estadio de meiosis I donde los cromosomas homólogos llegan a estar íntimamente asociados.

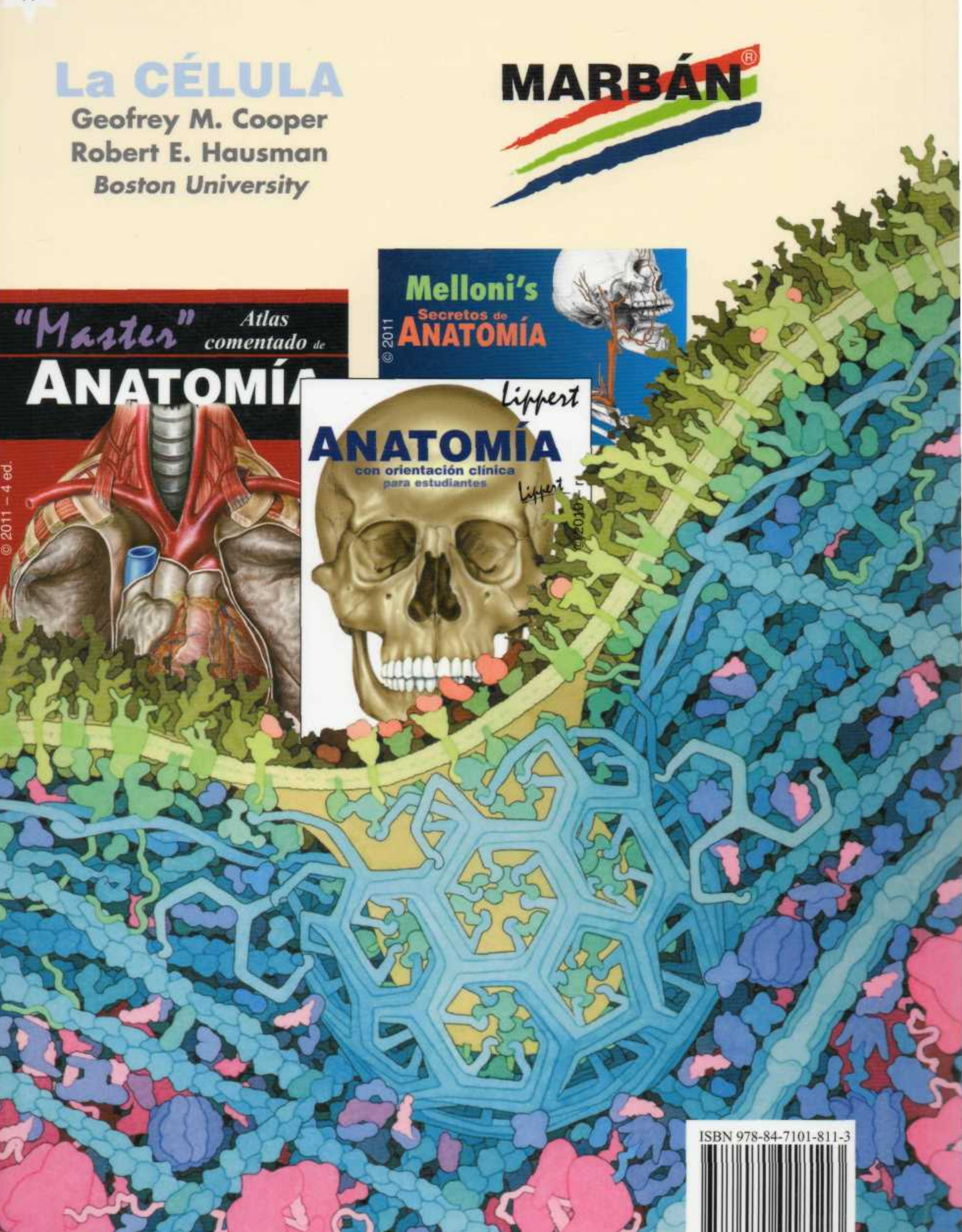
zigoto Óvulo fecundado.

zona señalizadora Determinante de reconocimiento formado por el plegamiento tridimensional de una cadena polipeptídica.

Índice

Nota: Los números de página en *cursiva* indican que la información aparece en figuras o tablas.

Formato 17



ISBN 978-84-7101-811-3
9 788471 018113